HAL
open science

Approches thérapeutiques pour le traitement de la myopathie myotubulaire

Thibaud Jamet

To cite this version:

Thibaud Jamet. Approches thérapeutiques pour le traitement de la myopathie myotubulaire. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ123 . tel-00872087

HAL Id: tel-00872087

https://theses.hal.science/tel-00872087v1

Submitted on 11 Oct 2013

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

UM 41 – UMR 7104 – UMR S 964

THÈSE

présentée par :

Thibaud JAMET

soutenue le : 11 juillet 2012

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

Discipline/ Spécialité : Aspect moléculaire de la cellule

Approches thérapeutiques pour le traitement de la myopathie myotubulaire

THÈSE dirigée par :

M. MANDEL Jean-Louis	Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme SALVETTI ANNA	Directeur de recherches, ENS de Lyon
M FURLING Denis	Directeur de recherches, G. H. Pitié-Sapétrière

---

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M KOENIG Michel	Professeur, Université de Strasbourg
Mme BUJ-BELLO Anna	Chargée de recherche, Généthon
M METZGER Daniel	Directeur de recherches, Université de Strasbourg

Remerciements

J'adresse toute ma gratitude à madame le docteur Anna Buj-Bello et à monsieur le professeur Jean-Louis Mandel pour m'avoir offert l'opportunité de cette thèse et pour avoir dirigé ce travail à l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC) de Strasbourg et au Généthon d'Evry.

Mes respectueux sentiments s'adressent aussi à :
Madame le docteur Anna Salvetti,
Monsieur le docteur Denis Furling,
Monsieur le professeur Michel Koenig,
Monsieur le docteur Daniel Metzger,
pour avoir accepté de juger ce manuscrit.
Mes sincères remerciements vont également aux équipes du docteur Laporte et du docteur Buj-Bello, au personnel des plateformes de l'IGBMC et du Généthon pour leur gentillesse et leur aide durant ces travaux.

A Céline, ma femme,

A mon frère,

A mes parents,

A mes beaux parents,

A mes amis.

Abréviations

AAV : virus associé aux adénovirus.

AD-CNM : forme autosomique dominante des myopathies centronucléaires.

ADN :acide désoxyribonucléique.

AHNAK : géant en Hébreu.

Akt = Protein Kinase B (PKB).

ANOVA : « Analysis of variance ».

AR-CNM : forme autosomique récessive des myopathies centronucléaires.

ARF6 : « ADP-ribosylation factor 6 ».

ARN : acide ribonucléique.

ATP : adénosine triphosphates.

BI = biceps.

BIN1 : amphiphysine 2.

BSA : « bovin serum albumin »

$CaCl_2$: chlorure de calcium.

CAP : portéine de capside.

CCA : corps cellulaires apoptotiques.

CD4/8 : « cluster of differentiation 4/8 ».

C. elegans : *Caenorhabditis elegans.*

Ced : cell death-abnormal.

CMT : Charcot-Marie-Tooth de type.

CMV : cytomégalovirus.

CNM : les myopathies centronucléaires.

ΔCqI : différence entre le cycle de quantification pour le gène d'intérêt dans l'échantillon de référence et dans l'échantillon d'intérêt.

ΔCqRef : différence entre le cycle de quantification pour le gène de référence dans l'échantillon de référence et dans l'échantillon d'intérêt.

CSA : aire maximale transversale du muscle.

Da : Dalton.

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole.

DENN : « differentially expresses in normal versus neoplastic » ;

DEPC : « Diethylpyrocarbonate ».

DES : desmine.

DHPLC : « denaturing high performance liquid chromatography ».

DHPR : dihydropiridine récepteur.

Dlg1 : « Disks large homolog 1 ».

DM : dystrophies myotoniques.

D. melanogaster : *Drosophila melanogaster*.

DMEM : « Dulbecco's modification of Eagle's medium ».

DNM2 : dynamine 2.

DPNH : « Reduced diphosphopyridine nucleotide ».

D rerio : *Danio rerio.*

DSP : double spécificité.

DTT : « dithioérythritol ».

EC : échantillon contrôle ou de référence.

EDL : extenseur digitorum longus.

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique.

EE : endosome précoce.

EEA1 : « Early Endosome Antigen 1 protein ».

EGFR : « Epidermal growth factor receptor ».

EGI : efficacité des amorces du gène d'intérêt.

EGRef : efficacité des amorces du gène de référence.

EGTA : ethylene glycol tetraacetic acid.

EI : échantillon d'intérêt.

ERK : « extracellular-signal-regulated kinases ».

ErrT : Erreur type.

ET : écart type.

FGF1 : facteur de croissance des fibroblastes 1.

FYVE : (Fab1p, YOTB, Vac1p and EEA1).

GA = gastrocnémus.

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.

HE : hématoxyline-éosine.

HEK293 : « Human Embryonic Kidney 293 cells »

HeLa : « Henrietta Lacks cell ».

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique.

IGF-1 : « insulin growth factor 1 ».

ITR : « inverted terminal repeates ».

JUMPY : MTMR14

KCl : chlorure de potatium.

KH2PO4 : KH_2PO_4, Monopotassium phosphate.

KO/mKO : mutant.

KO/mKO-AAV : mutant plus AAV.

KO/mKO-PBS : mutant contrôle.

Lamp-1 : « Lysosomal-associated membrane protein 1 ».

LE/LY : endosomes tardifs/pré-lysosomes.

ly : lysosome.

M. avium : Mycobacterium avium.

MgSO4 : $MgSO_4$, sulfate de magnésium.

MLD : muscles larvaires du dos.

MLV : muscles larvaires du ventre.

M. musculus : Mus musculus.

M.O.M : « Mouse On Mouse ».

MTM1 : myotubularine.

MTOR, mTOR : « mammalian target of rapamycin ».

MTM1cs = MTM1c375s.

MTMR : protéines associées à la myotubularine.

MVB : corps multivésiculaires.

MVB/LE : corps multivésiculaire/endosome tardif.

$\bar{n}$ = moyenne des échantillons.

n = nombre total d'échantillons.

n0 = souris morte.

n1 = souris en vie.

NaCl : chlorure de sodium.

NADH-TR : coloration nicotinamide adénosine dinucléotide Tétrazolium réductase.

NaF : fluorure de sodium.

NaHCO3 : $NaHCO_3$, hydrogénocarbonate de sodium.

N-CAM : « Neural Cell Adhesion Molecule ».

NF-L : neurofilament-L.

ni = échantillon i.

NRQ = quantité relative normalisée.

nt : nucléotides.

nTot = nombre de souris au départ.

O2 : O_2, dioxygène.

PAGE : « Polyacrylamide gel electrophoresis ».

PARP : « Poly (ADP-ribose) polymerase ».

PBS : « Phosphate buffered saline ».

PCR : « polymerase chain reaction ».

PVDF : polyvinylidene difluoride.

Ph : phagosome.

PH : « Pleckstrin homolgy ».

PH-GRAM : « Pleckstrin Homology/ Glucosyltransferase, Rab-like GTPase Activator and Myotubularins ».

PI3K : PI3 kinase.

Ph-ly : phago-lysosome.

PI : phosphatidylinositol.

PI3P : phosphatidylinositol-3-phosphate.

PI3K : phosphatidyl-inositol 3 Kinases.

PI3K-CI : PI3K de classe I.

PI3K-CII : PI3K de classe II.

PI3K-CIII : PI3K de classe III.

PI3,5P : phosphatidylinositol-3,5-biphosphates.

PI4P : phosphatidylinositol-4-phosphate.

PI3,4,5P_3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphates.

PIKfyve : « phosphoinositide kinase for five position containing a FYVE finger ».

$\bar{P}_t$ = poids moyen au temps t.

PTEN : « phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 ».

PTP : protéines tyrosines phosphatase.

Q = quantité.

QUA = quadriceps.

RBS : « Rep binding sequence ».

RE : réticulum endoplasmique.

REP : protéine de réplication.

RID : « Rac induced recruitment domain ».

RME-8 : « Receptor mediated endocytosis 8 ».

Rq=Ration de quantité.

RS : réticulum sarcoplasmique.

RYR1 : ryanodine récepteur 1.

S. cerevisiae : Saccharomyces cerevisiae.

SDS : sodium dodécyl-sulfate.

SERCA : « Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} pumps SERCA ».

SHH : Sonic Hedgehog.

SID : « SET (Su(var), Enhancer of zeste, Trithorax).

SOL = soléaire.

SSCP : « single-strand conformation polymorphism ».

TA = tibialis antérieur.

TAE : Tris, Acétate, EDTA.

TGFb : « *Transforming growth factor-β* ».

TI : taux de noyaux internalisés.

TNF-α : « tumor necrosis factor-α ».

TP : taux de noyaux périphériques.

TRI = triceps.

TSt = taux de survie durant la période t, exprimé en pourcentage.

VP :protéine virale.

Vps : « vacuolar protein sorting ».

XL-MTM : myopathie myotubulaire liée au chromosome X.

WT : sauvage.

WT-AAV : contrôle plus AAV.

WT-PBS : contrôle.

Table des matières

Remerciements.....3
Abréviations.....5
Table des matières.....10
1 Introduction.....15
1.1 La myopathie myotubulaire.....16
Figure 1 : Principales caractéristiques histologiques des muscles de patients atteints de la forme sévère de myopathie myotubulaire appartenant à la famille des myopathies centronucléaires.....16
Figure 2 : Principales caractéristiques histologiques des muscles de patients atteints de la forme moins sévère de myopathie myotubulaire appartenant à la famille des myopathies centronucléaires. 17
Figure 3 : Principales caractéristiques histologiques des muscles de patients atteints de la forme autosomique récessive des myopathies centronucléaires.....17
Figure 4 : Principales caractéristiques histologiques des muscles de patients atteints de la forme autosomique dominante des myopathies centronucléaires.....17
***1.1.1 Phénotypes des myopathies centronucléaires*.....18**
***1.1.2 Histologie de la maladie*.....21**
Figure 5 : Organisation de la triade dans le muscle.....23
***1.1.3 Identification du gène*.....29**
1.2 La famille des protéines homologues à la myotubularine.....31
Figure 6 : La famille des protéines associées à la myotubularine. 32
***1.2.1 Identité de la famille : le domaine protéine tyrosine phosphatase*.....33**
***1.2.2 La fonction des MTMRs*.....34**
Figure 7 : Les substrats des MTMRs et leur localisation dans la cellule.....36
Figure 8 : les différentes kinases qui forment les substrats des MTMRs.....37
***1.2.3 Le rôle des différentes MTMRs*.....41**
1.3 La myotubularine.....46
***1.3.1 Ses substrats*.....46**
***1.3.2 Le rôle de la myotubularine dans le muscle*.....48**
Figure 9 : Phénotype physiologique et histologique dans le modèle poisson de la myopathie myotubulaire.....50
Figure 10 : Phénotype physiologique et histologique du modèle murin de la myopathie myotubulaire.....52

Figure 11 : Phénotype physiologique et histologique du modèle canin de la myopathie myotubulaire....53

1.4 La thérapie génique....54

1.4.1 Les virus associés aux adénovirus....55

Figure 12 : Génome, structure et cheminement du virus associé aux adénovirus et les vecteurs dérivés....57

Figure 13 : schéma du processus de réplication des virus AAV et de production des vecteurs recombinants dérivés des AAV....58

1.4.2 Le tropisme cellulaire du virus AAV....59

1.4.3 Le cycle du virus....59

1.4.4 Les vecteurs recombinants dérivés des AAV....60

1.5 De la technologie aux traitements....62

1.5.1 La thérapie génique de la myopathie myotubulaire....63

2 Matériels et méthodes....66

2.1 Souches et modèles murins....67

2.1.1 Élevage des animaux....67

2.1.2 Les modèles mutants complets et muscles spécifiques....67

2.2 Expérimentation animale....67

2.2.1 Anesthésie....67

2.2.2 Injection intramusculaire....68

2.2.3 Injection intraveineuse....68

2.3 Plasmides et production des vecteurs....68

2.3.1 Plasmides....68

2.3.2 Production des vecteurs recombinants....69

2.4 Doses de vecteurs....70

2.4.1 Injection intramusculaire : le modèle mKO....70

2.4.2 Injection intramusculaire : le modèle KO....71

2.4.3 Injection intraveineuse....71

2.5 Préparations histologiques....72

2.5.1 Les muscles....72

2.5.2 Les organes....72

2.6 Colorations histologiques....73

2.6.1 Hématoxyline-éosine....73

2.6.2 Hématoxyline-éosine-safran....73

2.6.3 NADH-TR....74

2.6.4 Rouge Sirius....74

2.7 Immunodétections....74

2.7.1 Laminine....75

2.7.2 Myotubularine, RYR1, Desmine.....75
2.7.3 Dysferline, DHPR1α et sarcaluménine.....76

2.8 Quantifications histologiques.....77
2.8.1 Aire.....77
2.8.2 Diamètre.....78
2.8.3 Profil.....79
2.8.4 Noyau.....79

2.9 Extraction des protéines.....80
2.9.1 Origine : coupes histologiques.....80
2.9.2 Origine : organe entier.....80
2.9.3 SDS-PAGE.....81
2.9.4 Révélation des protéines.....82
2.9.5 Analyse.....83

2.10 Extraction d'acide nucléique.....83
2.10.1 Extraction d'ARN :.....83

2.11 Quantification de l'expression génique.....85
2.11.1 Traitement à la DNAse.....85
2.11.2 Reverse transcription.....85
2.11.3 PCR quantitative.....85
2.11.4 Analyse.....87

2.12 Evaluation fonctionnelle.....88
2.12.1 Test : Activité.....88
2.12.2 Le test d'échappement.....88
2.12.3 Force isolée.....89
2.12.4 Survie.....90
2.12.5 Poids.....90
2.12.6 Analyse statistique.....91

3 Résultats.....92

3.1 Développement du traitement de la myopathie myotubulaire par la thérapie génique.....93
3.1.1 Étude du fonctionnement et de l'efficacité de la nouvelle cassette thérapeutique Des-MTM1 sur le muscle de souris atteint de myopathie myotubulaire.....93

Figure 14 : Analyse de l'expression et de l'effet du nouveau vecteur AAV1-DES-MTM1 sur le muscle déficient en myotubularine KO après 2 semaines d'expression. 97

Figure 15 : Analyse de l'expression et de l'effet du nouveau vecteur AAV1-DES-MTM1 sur le muscle déficient en myotubularine mKO après 4 semaines d'expression. 99

3.1.2 Preuve de concept de l'efficacité du traitement de thérapie génique sur l'ensemble de l'organisme murin atteint de myopathie myotubulaire.....100

3.1.3 Effets du vecteur AAV9-DES-MTM1 sur le modèle murin de la myopathie myotubulaire.....100

Tableau 1 : Récapitulatif des résultats des analyses de caractérisation des effets du vecteur AAV9-DES-MTM1 sur les modèles KO et mKO.....104

3.1.4 Spécificité tissulaire du vecteur AAV9-DES-MTM1.....105

Figure 16 : Analyse du cœur des souris mutantes 6 mois après l'injection intraveineuse du vecteur thérapeutique AAV9-DES-MTM1.....108

Figure 17 : Niveau de myotubularine et histologie de plusieurs organes vitaux chez la souris KO 6 mois après l'injection du vecteur thérapeutique AAV9-DES-MTM1.....110

3.2 Étude sur l'efficacité thérapeutique de MTMR2 chez les souris déficientes en myotubularine.....111

3.2.1 Effets du vecteur AAV1-DES-MTMR2 sur le muscle du modèle murin KO. 111

Figure 18 : Effets du vecteur AAV1-DES-MTMR2 15 jours après l'administration intramusculaire dans le tibialis antérieur et l'EDL du mutant KO.....114

3.2.2 Stratégie pour augmenter la quantité de protéine MTMR2 dans le muscle des souris déficientes en myotubularine.....115

Figure 19 : Effets du vecteur AAV9-DES-MTMR2 sur le tibialis antérieur et EDL mutant KO 15 jours après l'injection intramusculaire.....118

3.3 Rôle de l'activité phosphatase de la myotubularine dans l'action thérapeutique.....119

3.3.1 Effets de la myotubularine inactive dans le muscle du modèle murin de la myopathie myotubulaire.....119

Figure 20 : Quantification de la myotubularine dans le muscle tibialis antérieur mKO de souris 4 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt.....121

Figure 21 : Quantification de la myotubularine dans les muscles tibialis antérieurs KO 2 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt. 122

Figure 22 : Morphologie des muscles tibialis antérieurs mKO 4 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt.....126

Figure 23 : Morphologie des muscles tibialis antérieurs KO 2 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt.....128

Figure 24 : Marquage du RYR1 et du DHPR1α dans les muscles tibialis antérieurs mKO 4 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt. 132

3.3.2 Effets de la myotubularine active et inactive sur le muscle normal.....133

Figure 25 : Illustration des vacuoles présentes dans les muscles tibialis antérieurs mKO 4 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt. 136

Figure 26 : Caractérisation des vacuoles présentes dans les muscles tibialis antérieurs mKO 4 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt. 139

Figure 27 : Infiltrats cellulaires dans les muscles tibialis antérieurs mKO 4 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt.....142

4 Discussion.....143

4.1 Discussion sur le développement du traitement de la myopathie myotubulaire par la thérapie génique.....144

4.2 Discussion des effets de la protéine MTMR2 sur le muscle KO.....148

4.3 Discussion sur le rôle de l'activité phosphatase de la myotubularine dans son action thérapeutique sur la myopathie myotubulaire.....150

5 Bibliographie.....154

6 Annexes.....175

Annexe 1 : expression du transgène dans le cœur et effet sur l'histologie dans le mutant mKO 12 mois après l'injection du nouveau vecteur thérapeutique AAV9-DES-MTM1.. .176

Annexe 2 : « Gene replacement therapy for myotubularin deficiency prolongs survival and restores muscle function in murine and canine models of X-linked myotubular myopathy ». 177

1 Introduction

1.1 La myopathie myotubulaire

Les myopathies centronucléaires (CNM) sont un ensemble de myopathies congénitales rares, dont fait partie la myopathie myotubulaire. Elles sont groupées sous cette dénomination en raison de la présence de noyaux en position centrale dans les fibres musculaires hypotrophiques. Les patients atteints de CNM présentent cependant une atteinte musculaire avec un phénotype extrêmement variable et des complications diverses. La discrimination des différentes formes de CNM, par analyse histologique du muscle, s'est révélée difficile. Seul le mode de transmission génétique a permis de distinguer trois groupes principaux de CNM : la forme liée au chromosome X ou myopathie myotubulaire (XL-MTM) (Figure 1 et 2), la forme autosomique récessive (AR-CNM) (Figure 3) et la forme autosomique dominante (AD-CNM) (Figure 4). On note l'apparition de formes sporadiques récemment découvertes ((Fujimura-Kiyono et al., 2008) ; (Romero, 2010)). L'identification des gènes responsables des différentes formes de CNM ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques.

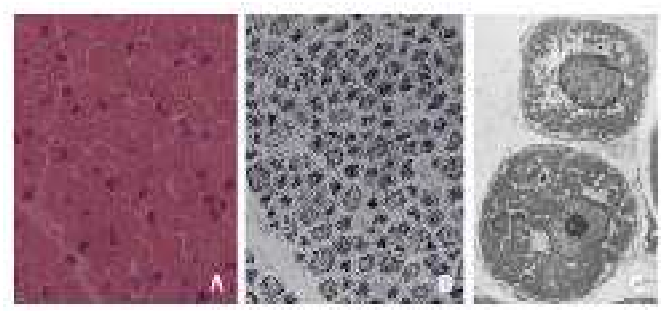


Figure 1 : Principales caractéristiques histologiques des muscles de patients atteints de la forme sévère de myopathie myotubulaire appartenant à la famille des myopathies centronucléaires.

A/ Coupe transversale de muscle de patient colorée en hématoxyline-éosine. **B/** Coupe transversale de muscle de patient colorée au NADH-TR. **C/** Structure interne de deux myofibres provenant de patient en microscopie électronique. Adapté de Romero 2010 (Romero, 2010).

Figure 2 : Principales caractéristiques histologiques des muscles de patients atteints de la forme moins sévère de myopathie myotubulaire appartenant à la famille des myopathies centronucléaires.

A/ Coupe transversale de muscle de patient colorée en hématoxyline-éosine. **B/** Coupe transversale de muscle de patient colorée au NADH-TR. **C/** Structure interne d'une myofibre provenant du muscle de patient en microscopie électronique. Adapté de Romero 2010 (Romero, 2010).

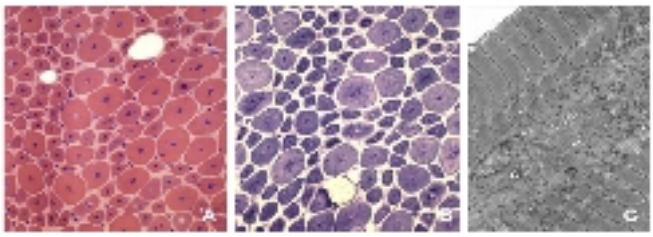


Figure 3 : Principales caractéristiques histologiques des muscles de patients atteints de la forme autosomique récessive des myopathies centronucléaires.

A/ Coupe transversale de muscle de patient colorée à l'hématoxyline-éosine. **B/** Coupe transversale de muscle de patient colorée au NADH-TR. **C/** Structure interne d'une myofibre provenant du muscle de patient en microscopie électronique. Adapté de Romero 2010 (Romero, 2010).

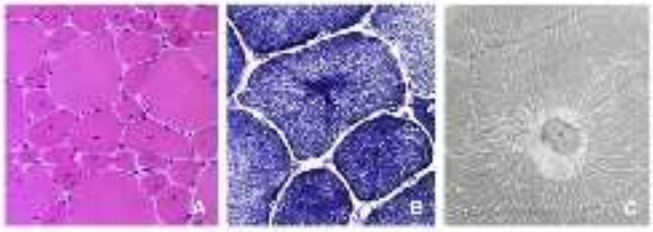


Figure 4 : Principales caractéristiques histologiques des muscles de patients atteints de la forme autosomique dominante des myopathies centronucléaires.

A/ Coupe transversale de muscle de patient colorée à l'hématoxyline-éosine. **B/** Coupe transversale de muscle de patient colorée au NADH-TR. **C/** Structure interne d'une myofibre de muscle de patient en microscopie électronique. Adapté de Romero 2010 (Romero, 2010).

1.1.1 Phénotypes des myopathies centronucléaires

Les myopathies centronucléaires.

Les premiers patients CNM mâles décrits dans la littérature ont tous en commun une atteinte musculaire qui se traduit par une réduction importante de la force ((Van Wijngaarden et al., 1969) ; (Spiro et al., 1966)). Ce phénomène est cependant variable en ce qui concerne le degré d'atteinte et l'âge d'apparition des symptômes, ce qui permet de définir deux populations de patients : les patients sévèrement atteints qui décèdent rapidement, et les phénotypes moins sévères qui permettent d'atteindre l'âge adulte.

Le premier patient décrit a développé une atteinte musculaire durant l'enfance sans signe particulier à la naissance (Spiro et al., 1966), tandis que les cas suivants présentaient une atteinte musculaire périnatale, se traduisant par une hypotonicité musculaire généralisée et de graves problèmes respiratoires qui ont nécessité le recours à une aide ventilatoire (Van Wijngaarden et al., 1969). Van Wijngaarden et ses collaborateurs ont observé que l'hypotonie entraînait un retard dans le développement moteur de ces enfants. L'analyse du quotient intellectuel et du système nerveux périphérique n'a pas révélé d'anomalie, renforçant l'idée d'une atteinte majoritairement musculaire (Van Wijngaarden et al., 1969). D'autres patients décrits ultérieurement ont développé une atteinte musculaire plus sévère que les précédents. L'espérance de vie varie parmi la population de patients de quelques jours, jusqu'à l'adolescence ((Van Wijngaarden et al., 1969) ; (Barth et al., 1975) ; (Bucher et al., 1986) ; (Donders et al., 1986) ; (Oldfors et al., 1989) ; (Braga et al., 1990)). Dans la majorité des cas, les symptômes se déclarent durant la vie fœtale et se caractérisent par un poly-hydramnios (Barth et al., 1975) et par des mouvements fœtaux réduits ((Barth et al., 1975) ; (Bucher et al., 1986) ; (Donders et al., 1986) ; (Oldfors et al., 1989) ; (Braga et al., 1990)). A la naissance, les nouveaux nés s'asphyxient et présentent une hypotonicité généralisée très importante ((Barth et al., 1975) ; (Bucher et al., 1986) ; (Donders et al., 1986) ; (Oldfors et al., 1989) ; (Braga et al., 1990)). Dans 80 % des cas l'arrêt respiratoire est la principale cause de décès, une des conséquences de la faiblesse musculaire généralisée ((Donders et al., 1986) ; (Barth et al., 1975)). Le cœur des patients myopathes ne présente pas d'anomalie fonctionnelle (Oldfors et al., 1989).

La première classification des CNM se base sur la gravité des phénotypes des patients en fonction de l'atteinte musculaire et de la durée de vie des patients. Trois groupes de classification apparaissent : phénotype sévère, intermédiaire et léger. L'utilisation de microsatellites et l'étude de

la ségrégation de la maladie chez les différents patients ont réduit la localisation des gènes responsables sur le génome humain (Bucher et al., 1986). L'utilisation du séquençage sur ses portions chromosomiques isolées a permis d'identifier plusieurs gènes et le reclassement des CNM. Le reclassement génétique donne naissance à quatre groupes. Il provoque également une redistribution des phénotypes.

La forme autosomale dominante (AD-CNM ; Figure 4) est associée à des mutations dans le gène de la dynamine 2 (DNM2), une protéine impliquée dans la fission des vésicules de l'endocytose. Les phénotypes associés sont une atteinte musculaire légère ou moyenne dans la quasi totalité des cas (Romero, 2010).

La forme autosomale récessive (AR-CNM ; Figure 3) est causée par des mutations dans le gène de l'amphiphysine 2 (BIN1). L'amphiphysine est impliquée dans la formation du tubule longitudinal musculaire et la fission des vésicules d'endocytose. Le phénotype moyen est majoritairement associé à la forme AR-CNM avec quelques cas sévères (Romero, 2010).

Les formes sporadiques de CNM sont en train d'émerger et elles sont caractérisées par les gènes RYR1 et hJUMPY alias MTMR14. Elles regroupent des phénotypes sévères comme moyens ((Romero, 2010) ; (Jungbluth et al., 2007) ; (Wilmshurst et al., 2010)).

Enfin la forme liée au chromosome X ou myopathie myotubulaire (XL-MTM ; Figure 1 et 2) est due à des mutations dans le gène de la myotubularine (MTM1) et regroupe à une très large majorité des phénotypes sévères ((Jungbluth et al., 2007) ; (Fujimura-Kiyono et al., 2008) ; (Romero, 2010) ; (Tosch et al., 2006)).

Deux sous-groupes de patients atteints de myopathie myotubulaire peuvent être distingués en fonction du degré d'atteinte musculaire et de leur espérance de vie.

Le groupe des patients sévères est défini par une atteinte musculaire et un besoin d'assistance respiratoire important ainsi qu'une durée de vie inférieure à un an. Environ 80% des patients atteints de la myopathie myotubulaire sont dans le premier groupe. Le deuxième groupe contient les autres patients survivants dont la durée de vie est supérieure à un an avec une dépendance respiratoire plus ou moins importante et des symptômes musculaires plus faibles ((Barth et al., 1975) ; (Herman et al., 1999) ; (McEntagart et al., 2002)). Chez plusieurs patients, quelque soit le groupe d'appartenance phénotypique, des manifestations symptomatiques sont enregistrées durant la grossesse comme la présence d'un poly-hydramnios et des mouvements fœtaux réduits ((Barth et al., 1975) ; (Helliwell et al., 1998)). La maladie ne semble pas progressive par rapport au phénotype musculaire, qui se traduit par une hypotonicité généralisée des muscles des membres, respiratoires

et de la face (Barth et al., 1998). Outre ces symptômes, d'autres anomalies apparaissent de façon sporadique, notamment dans la population des patients avec une espérance de vie plus importante. Certains présentent des dysmorphies, comme des anomalies de la cage thoracique (côtes fines, hypoplasie pulmonaire, chylothorax) (Smets, 2008) et un cryptorchidisme (atteintes des testicules) (Bucher et al., 1986). Certains patients présentent également des complications telles que des calculs rénaux et biliaires, des dysfonctionnements du foie (hémorragie) ((Wallgren-Pettersson et al., 1995) ; (Herman et al., 1999)), et également des infections iatrogènes dues au matériel de réanimation (Sustersic et al., 2005). Les complications hépatiques ont entraîné le décès de plusieurs patients ((Herman et al., 1999) ; (Karger et al., 2005) ; (Sarnat et al., 1981)). La présence de ces complications augmente les causes de décès et rend le pronostique de survie plus aléatoire.

Phénotype des femmes porteuses de la mutation.

Bien que la grande majorité des femmes porteuses de la maladie ne présentent aucun symptôme, une faible proportion développe un phénotype musculaire similaire à celui des patients. L'expression des symptômes musculaires est variable selon les cas et, chez certaines patientes, il s'aggrave au cours du temps ((Jungbluth et al., 2003) ; (Grogan et al., 2005) ; (Pénisson-Besnier et al., 2007)).

Quelques cas de patientes présentant un phénotype sévère ont été rapportés. Toutes ont présenté, à la naissance, une hypotonicité sévère ((Schara et al., 2003) ; (Helliwell et al., 1998) ; (Jungbluth et al., 2003)), avec parfois une asphyxie compensée par assistance respiratoire et des problèmes de déglutition ayant abouti à la mise en place d'un système de nutrition artificielle ((Helliwell et al., 1998) ; (Jungbluth et al., 2003)). L'une des patientes est morte à cinq mois des suites d'une infection pulmonaire (Helliwell et al., 1998). L'étude du développement fœtal de ces patientes a révélé la présence occasionnelle de mouvements fœtaux réduits ((Helliwell et al., 1998) ; (Schara et al., 2003)) et de poly-hydramnios (Helliwell et al., 1998).

Les phénomènes extrêmes restent cependant marginaux et la majorité des patientes ont un phénotype moins sévère. L'apparition des symptômes musculaires se fait en général autour de l’âge de cinq ans ((Tanner, 0rstavik et al., 1999) ; (Hammans et al., 2000) ; (Sutton et al., 2001) ; (Grogan et al., 2005)), voire plus tardivement ((Grogan et al., 2005) ; (Pénisson-Besnier et al., 2007)). La maladie est progressive mais permet une durée de vie normale (Pénisson-Besnier et al., 2007). Là encore, l'atteinte semble essentiellement musculaire, car il n'y a ni atteinte intellectuelle ((Tanner, 0rstavik et al., 1999) ; (Grogan et al., 2005)), ni atteinte du système nerveux central (Hammans et

al., 2000) ou périphérique (Sutton et al., 2001).

L'état d'inactivation du chromosome X semble moduler les conséquences phénotypiques de la mutation ((Jungbluth et al., 2003) ; (Grogan et al., 2005) ; (Pénisson-Besnier et al., 2007)). L'inactivation aléatoire d'un des deux chromosomes X, selon le tissu, peut aussi expliquer la présence de variations de phénotype pour une même mutation ou pour des mutations différentes ((Grogan et al., 2005) ; (Tanner, 0rstavik et al., 1999) ; (Hammans et al., 2000) ; (Sutton et al., 2001)).

En revanche, les mutations dans le gène MTM1 n'ont pas d'influence sur l'activation du chromosome X, puisque les fréquences d'inactivation du chromosome X retrouvées dans la population de patientes sont identiques à celles de la population générale (Kristiansen et al., 2003).

1.1.2 Histologie de la maladie

La dominance d'un phénotype musculaire dans l'ensemble des patients a focalisé les recherches concernant la compréhension des mécanismes physiopathologiques sur le muscle squelettique.

Histologie du muscle normal.

Le muscle squelettique est un organe qui remplit deux fonctions physiologiques essentielles :

1) grâce à ses propriétés de contractilité et d'élasticité, il permet au corps de réaliser tous ses mouvements volontaires et d'assurer le maintien de la posture.

2) Il joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et protéique.

Plus de 600 muscles différents couvrent environ 40% de la surface du corps et, bien que le tissu squelettique soit toujours, dans sa forme mature, un syncytium plurinucléé au stade post-mitotique, sa composition peut varier avec sa position pour s'adapter à la contrainte mécanique : on parle alors de typage des fibres musculaires.

Les muscles squelettiques humains apparaissent entre la 9ème et la 10ème semaine de gestation. Les fibres musculaires primaires ou muscles fœtaux ressemblent à des tubes avec un noyau en position centrale. Le noyau, de grande taille, est entouré d'un halo de mitochondries, de réticulum endoplasmique (RE) et des granules de glycogène, ainsi que des sarcomères en voie d'assemblage.

La 14ème semaine est caractérisée par la migration du noyau central vers la périphérie. Les fibres musculaires secondaires sont alors constituées de deux à trois noyaux et de myofibrilles orientés dans l'axe de la fibre. La vitesse de maturation entre les fibres n'est pas égale car à ce stade subsistent encore des myotubes du stade précédent (Gayathri et al., 2000).

A partir de la 24ème semaine, les deux principaux types de fibres musculaires, distingués en fonction des chaînes de myosine qui composent les sarcomères, apparaissent. Les fibres de type I sont caractérisées par la présence de formes lentes de myosine et utilisent le métabolisme oxydatif pour réaliser des contractions lentes. Les fibres de type II ont une prépondérance de myosine rapide et un métabolisme oxydatif (type IIa) ou glycolytique (type IIb) à contraction rapide. A la naissance, les fibres musculaires ont une morphologie de fibres matures ou adultes. Une coupe transversale de muscle montre des myofibres polygonales, de diamètres homogènes, avec des noyaux situés en périphérie ((Gayathri et al., 2000) ; (Gundersen, 2011)).

La croissance du muscle s'opère selon deux grands phénomènes qui se chevauchent parfois : l’augmentation du nombre des fibres et l’augmentation de la taille des fibres. Du stade fœtal jusqu'à la naissance les progéniteurs se divisent, se différencient en myoblastes, pour enfin fusionner entre eux et assurer la formation d'un syncytium plurinucléé appelé aussi myotube (Bryson-Richardson et al., 2008). Autour de la naissance et jusqu'à l'âge adulte, la division des progéniteurs régresse jusqu'à un niveau basal et les myofibres grossissent. Le grossissement des fibres musculaires est influencé par l'influx nerveux et les variations de calcium qui en résultent, via des effecteurs comme la calmoduline, et des voies hormonales comme la myostatine (famille des TGFb) et l'IGF-1 (insulin growth factor 1) (Gundersen, 2011).

A l'âge adulte, la division des progéniteurs n'est activée que lorsque des dommages importants apparaissent dans le muscle (Bryson-Richardson et al., 2008).

Dans le syncytium adulte, les noyaux sont situés à la périphérie de la fibre musculaire, au dessous de la membrane plasmique (sarcolemme) (Figure 5). La structure responsable de la contraction est le réseau de myofibrilles alimenté en énergie par les mitochondries réparties de façon homogène dans le muscle (Figure 5). Les myofibrilles, qui s’étendent sur toute la surface du grand axe de la cellule musculaire, sont constituées d’unités contractiles, les sarcomères (Figure 5). Le sarcomère est formé de l'assemblage régulier de filaments fins d’actine et de filaments épais de myosine, qui donnent des structures striées en microscopie électronique. Le sarcomère est délimité par deux disques Z adjacents, région dans laquelle les filaments d’actine se réunissent. Il est constitué de deux bandes I contenant des filaments fins qui entourent la bande A dans laquelle les filaments fins

et épais se chevauchent (Figure 5). Au centre de la bande A, la ligne M est le point de liaison des filaments épais (Luther, 2009). La desmine, protéine exclusivement musculaire, forme un troisième réseau de filaments dits intermédiaires et est localisée au niveau du disque Z ((Li et al., 1989) ; (Costa et al., 2004))**.** Le cytosquelette interne de la myofibre est relié à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de deux costamères. Les costamères sont situés en position latérale dans les disques Z et les lignes M (Figure 5), et les jonctions myotendineuses, relient l'extrémité des myofibres aux tendons. Le complexe multi-protéique associé à la dystrophine, présent dans ces deux structures, est ancré dans le sarcolemme et contribue au maintien de cette liaison (Lapidos et al., 2004).

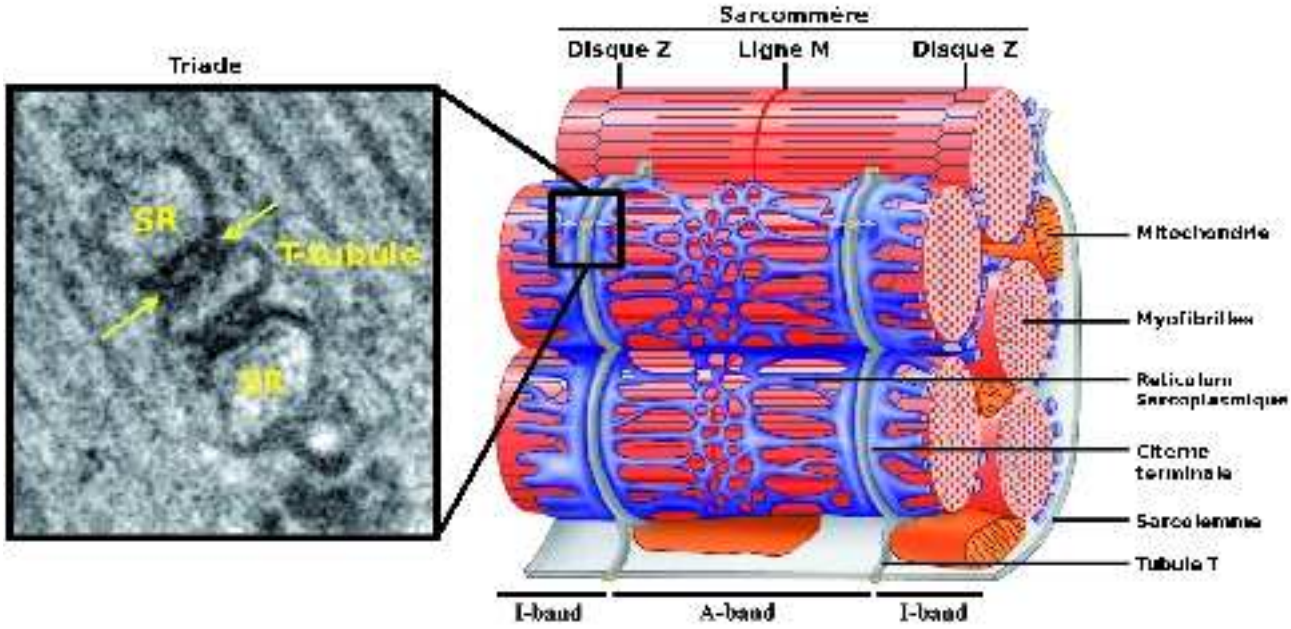


Figure 5 : Organisation de la triade dans le muscle.

L'image de gauche représente un électron micrographe d'une triade musculaire. T-tubule : tubule transverse ; SR : réticulum sarcoplasmique. Image de droite : schéma de l'organisation interne d'une fibre musculaire (Al-Qusairi et al., 2011).

Les mitochondries sont réparties de façon homogène dans la fibre musculaire afin d'apporter l'ATP nécessaire à la production de force dans l'ensemble de la fibre (Giorgi et al., 2009). Ses fonctions sont dépendantes du calcium, ce qui nécessite un contact permanent avec le réticulum endoplasmique (RE), principale source de calcium intracellulaire dans la cellule (Giorgi et al., 2009). Les mitochondries sont également localisées à proximité de la membrane plasmique, où elles tamponnent le calcium intracellulaire qui pénètre dans la cellule par la membrane(Lebiedzinska et al., 2009) (Figure 5).

Les fibres musculaires contiennent une structure primordiale et dynamique pour la contraction musculaire, la triade (Figure 5). Cette structure remplit le rôle de convertisseur de signaux nerveux en influx calcique, également appelé couplage de l'excitation-contraction. La triade est constituée d'une invagination du sarcolemme, le tubule transverse ou T-tubule, et entourée de deux protubérances du réticulum sarcoplasmique (RS: réticulum endoplasmique lisse de la cellule musculaire) appelées citernes terminales. Le T-tubule est enrichi en dihydropyridine récepteur (DHPR) qui fait partie de la famille des récepteurs de type L. Le DHPR est composé de cinq sous-unités (α1, γ, δ (transmembranaire), β (soluble) et α2), avec des spécificités tissulaires comme par exemple, la sous-unité α1s qui est spécifique du muscle squelettique et la sous-unité α1c du muscle cardiaque. La sous-unité principale du canal est la sous-unité α qui forme le pore du canal et détecte la dépolarisation membranaire et participe à l'influx calcique (Dulhunty, 2006). Les autres sous-unités participent à la régulation de la fonctionnalité du canal (Flucher et al., 2005). Le réticulum sarcoplasmique (RS) est enrichi avec le canal ryanodine 1, ou récepteur ryanodine 1 (RYR1), qui contrôle la libération du calcium intracellulaire. Le RYR1 est spécifique du muscle squelettique et interagit avec le DHPR. Lors de l'influx calcique, le DHPR déclenche l'ouverture du RYR1. La triade est également composée d'autres protéines comme la calséquestrine, la junctine et la triadine (Dulhunty, 2006).

La mise en place de la triade, chez la souris illustre les principales étapes. La formation de la triade débute au stade embryonnaire (E) 15 dans la myofibre. Le T-tubule est localisé à proximité de l'anneau de myofibrilles périphériques. Les tubules vont grandir en taille et s'enfoncer dans la myofibre tout en conservant une orientation longitudinale. A ce stade, les myofibrilles occupent l'ensemble du cytoplasme et le noyau a migré à la périphérie (Takekura et al., 2001). Après la naissance, il faut attendre trois semaines pour que les T-tubules retrouvent une orientation complètement transversale (Franzini-Armstrong, 1991). Le RYR1 apparaît sous forme de points dispersés sur le réticulum endoplasmique dans le cytoplasme. Durant la maturation de la triade, les

points s'organisent graduellement de façon transversale autour de la ligne Z. Après la naissance seule l'orientation transversale subsiste (Takekura et al., 2001). La formation de la triade se produit pendant la formation du T-tubule.

Au 14^{éme} jour embryonnaire, elles n'ont pas d'organisation et sont dispersées à proximité de la membrane plasmique. Le couplage périphérique de l'excitation contraction disparaît pour laisser place à une augmentation graduelle de la densité des interactions entre le DHPR et le RYR1.

Le stade avant la naissance contient majoritairement des diades. Les triades subissent également la réorganisation transversale rapide comme le T-tubule. Après la naissance, le RYR1 et le DHPR s'accumulent l'un en face de l'autre sur leurs membranes respectives en petits paquets espacés nommés pieds (Figure 5) (Takekura et al., 2001).

Histologie du muscle des patients atteints de myopathie myotubulaire (XLMTM).

Les biopsies musculaires faites chez les patients atteints de myopathie myotubulaire révèlent de nombreuses anomalies de structure, visibles quelque soit la sévérité du phénotype. De façon globale, la fibre musculaire du patient présente des caractéristiques histologiques la rapprochant des myotubes fœtaux. Cette observation est à l'origine du nom de « myopathie myotubulaire » donnée à cette forme de CNM. Mais la présence de caractéristiques histologiques propres aux fibres matures plaide pour un arrêt de la maturation.

La première caractéristique remarquable est la présence de fibres musculaires hypotrophiées (absence de croissance normale de la fibre) dans tous les muscles squelettiques (Figure 1). En effet, dans plusieurs muscles de patients âgés de quelques jours ou de quelques mois, dont le diaphragme, les myofibres sont significativement plus petites que celles provenant d'enfants normaux du même âge (Ambler, Neave et al., 1984), mais elles ont la même taille que des fibres provenant d'enfants morts avant terme (Silver et al., 1986).

La seconde caractéristique est une désorganisation de la structure des fibres qui ressemblent, dans leur grande majorité, à des myotubes fœtaux (Figure 1) ((Sarnat et al., 1981) ; (Ambler, Neave et al., 1984) ; (Helliwell et al., 1998)). Les noyaux ne sont plus en position périphérique dans la fibre, mais sont internalisés dans des proportions variables ((Ambler, Neave et al., 1984) ; (Helliwell et al., 1998) ; (Gayathri et al., 2000)). Silver et ses collaborateurs avancent une hypothèse intéressante pour expliquer la présence des noyaux internalisés et qui renforce l'idée d'un arrêt de maturation des myofibres. Les noyaux internalisés pourraient provenir de la fusion de myoblastes avec les myotubes pendant la croissance des fibres musculaires. Le myotube malade est alors incapable de

faire migrer le noyau (Silver et al., 1986). Les myofibrilles, assemblage de sarcomères, sont moins nombreuses et se présentent en paquets plus ou moins désorganisés à la périphérie de la fibre, laissant un halo dépourvu d'unités contractiles au centre (Figure 1) ((Ambler, Neave et al., 1984) ; (Ambler, Neave et Singer, 1984) ; (Silver et al., 1986) ; (Askanas et al., 1979)). L'ultrastructure des fibres montre que les paquets de myofibrilles présents dans les fibres sont matures, même s'ils sont désorganisés, car très peu sont liés au RE granuleux ((Ambler, Neave et Singer, 1984) ; (Silver et al., 1986)). Les mitochondries s'accumulent dans le centre de la fibre musculaire, souvent aux alentours du noyau ((Helliwell et al., 1998) ; (Sarnat et al., 1981) ; (Sarnat, 1990)). La quantité de triades dans les muscles de patients est variable tout comme l'organisation de leurs structures. La variation de structure au sein de ces triades, indique que le stade fœtal a été dépassé ((Ambler, Neave et al., 1984) ; (Ambler, Neave et Singer, 1984) ; (Dowling et al., 2009)). Chez certains patients, le RE granuleux forme des agrégats au centre de la fibre, dans lesquels les T-tubules, peu profonds, sont en position longitudinale et occasionnellement associés avec les cavéosomes ((Ambler, Neave et al., 1984) ; (Ambler, Neave et Singer, 1984) ; (Sarnat, 1990)). L'immunodétection d'une grande quantité de desmine, de vimentine, et de la forme embryonnaire de la myosine, souligne l'aspect immature de la fibre musculaire. L'expression de la desmine et de la vimentine évolue de façon inversement proportionnelle à la maturation de la fibre musculaire. La présence de myosine embryonnaire caractérise les myoblastes et les myotubes primaires ((Helliwell et al., 1998) ; (Sarnat, 1990) ; (Van Der Ven et al., 1995)). Le typage des fibres musculaires est une caractéristique qui n'apparaît que lors de la différenciation finale des myofibres (Helliwell et al., 1998). Dans beaucoup de biopsies de muscle de patients, le type I des myofibres est favorisé de 30 à 78% par rapport au nombre total de fibres ((Ambler, Neave et Singer, 1984) ; (Helliwell et al., 1998)). Certaines grandes fibres de type I subsistent (Sarnat et al., 1981), mais en règle générale les deux types sont majoritairement atrophiés (Helliwell et al., 1998). Des fibres musculaires matures sont retrouvées dans les muscles de certains patients (Sarnat et al., 1981).

La troisième caractéristique est la présence de jonctions neuromusculaires d'aspect immature dans les fibres musculaires de patients. Plusieurs caractéristiques histologiques de ces jonctions les rapprochent des jonctions neuromusculaires du stade fœtal ((Ambler, Neave et Singer, 1984) ; (Fidziańska et al., 1994)) :

1. les contacts entre l'axone et la fibre musculaire existent, mais sont peu nombreux ((Ambler, Neave et Singer, 1984)). La jonction neuromusculaire est de petite taille (Coërs et al., 1976), les adhésions focales et les crêtes le sont également (Ambler, Neave et Singer, 1984).

2. Les invaginations du sarcolemme sont peu nombreuses, peu profondes et mal développées ((Ambler, Neave et Singer, 1984) ; (Fidziańska et al., 1994)).
3. La protéine N-CAM permet l'adhésion de la jonction neuromusculaire. Sa distribution sur la jonction est anormale et appauvrie (Fidziańska et al., 1994). Elle est également accumulée à l'intérieur de la fibre (Helliwell et al., 1998). Ses caractéristiques se retrouvent lors de la formation de la jonction dans un muscle normal ((Helliwell et al., 1998) ; (Fidziańska et al., 1994)).

Bien que l'immaturité musculaire soit difficilement reproductible *in vitro* (Van Der Ven et al., 1995), la co-culture de cellules nerveuses normales et musculaires pathologiques, *in vitro*, n'a pas révélée d'arrêt de la maturation des jonctions neuromusculaires (Dorchies et al., 2001). L'immaturité de la jonction ne semble pas abolir complètement sa fonction, puisque la sur-stimulation des récepteurs à l'acétylcholine provoque une réponse musculaire (Robb et al., 2011). Plusieurs articles montrent que les muscles sont correctement innervés ((Coërs et al., 1976) ; (Ambler, Neave et Singer, 1984) ; (Sarnat, 1990)), avec des axones et les cellules de Schwann normales (Ambler, Neave et Singer, 1984). Bien que la preuve de l'altération de la conduction nerveuse dans les cas les plus sévères ne soit pas faite, chez le modèle poisson de la myopathie myotubulaire la stimulation nerveuse provoque la contraction du muscle (Dowling et al., 2009). De plus, Sarnat et ses collaborateurs ont montré, dans un cas de myopathie myotubulaire, des signes de nécrose et de régénération nerveuse (Sarnat et al., 1981), qui montrent un arrêt des interactions entre le nerf et le muscle. Un rôle majeur des nerfs dans le mécanisme pathologique semble fortement exclu.

Les patients du groupe des survivants présentent des caractéristiques histologiques communes avec les patients sévères. Les fibres musculaires sont de taille et ont une proportion de noyaux internalisés variables ((Spiro et al., 1966) ; (Barth et al., 1998) ; (Van Wijngaarden et al., 1969) ; (Bevilacqua et al., 2009)), pouvant aller jusqu'à 80% (Van Wijngaarden et al., 1969) en opposition à d'autres qui n'en n'ont aucun (de Goede et al., 2005). De plus, certaines fibres présentent plusieurs noyaux internalisés sur un même plan de coupe (Van Wijngaarden et al., 1969). Les fibres de type I semblent beaucoup plus atrophiées que le reste des fibres, mais leur proportion varie selon les patients. La morphologie des fibres est également disparate et oscille entre des caractéristiques de fibres matures (Van Wijngaarden et al., 1969) et immatures (halo de myofibrilles séparées des mitochondries et altérations de la localisation de N-CAM (Barth et al., 1998)).

Le groupe des patients survivants possède deux caractéristiques histologiques supplémentaires et

propres. Certaines myofibres possèdent un halo de mitochondries formant un cercle situé loin de la membrane plasmique. Dans la majorité des cas, ce cercle, ou « Necklace », contient un noyau, qui de ce fait est internalisé, mais pas central (Figure 4). Cet anneau contient également les protéines suivantes: la desmine, l'αB cristalline et SERCA 1 et SERCA 2. Ce type d'anneau est retrouvé majoritairement dans les fibres atrophiées et également dans les fibres de type I et II (Bevilacqua et al., 2009). La deuxième caractéristique est la présence d'adipocytes dans les muscles de certains patients ((Barth et al., 1998) ; (Van Wijngaarden et al., 1969)). Ce phénomène semble progressif (Barth et al., 1998), bien que l'ensemble des autres caractéristiques histologiques n'évolue que faiblement (Spiro et al., 1966).

Histologie musculaire des femmes porteuses de mutations XLMTM.

Les femmes porteuses des mutations présentent une atteinte histologique très variable. En effet certaines sont complètement asymptomatiques car la structure des fibres musculaires est normale (Keppen et al., 1987). L'autre groupe de patientes porteuses de mutations présente des atteintes histologiques variables, et des ressemblances avec l'histologie des patients mâles plus ou moins proches. La taille des fibres musculaires est variable selon les cas ((Helliwell et al., 1998) ; (Hammans et al., 2000) ; (Sutton et al., 2001) ; (Jungbluth et al., 2003) ; (Grogan et al., 2005) ; (Pénisson-Besnier et al., 2007) ; (Bevilacqua et al., 2009)) et reflète en partie le degré d'atteinte pathologique ((Hammans et al., 2000) ; (Sutton et al., 2001)). Chez la plupart des patientes, les fibres de types I sont prédominantes et souvent décrites comme atrophiées ((Helliwell et al., 1998) ; (Hammans et al., 2000) ; (Jungbluth et al., 2003) ; (Pénisson-Besnier et al., 2007) ; (Bevilacqua et al., 2009)), bien que ce ne soit pas le cas partout (Grogan et al., 2005). La proportion de noyaux internalisés varie de 10% (Helliwell et al., 1998) à 70-85% ((Sutton et al., 2001) ; (Grogan et al., 2005) ; (Bevilacqua et al., 2009) ; (Hammans et al., 2000)) et certaines fibres contiennent plus d'un noyau sur un même plan histologique (Hammans et al., 2000). La structure des myofibres est également atteinte. Chez certaines patientes, des myofibres sont retrouvées avec un halo dépourvu de myofibrilles autour des noyaux et en position centrale de la myofibre (Jungbluth et al., 2003). Des fibres musculaires d'autres patientes présentent une accumulation de mitochondries et de SR au centre de la fibre avec ou sans noyau central ((Hammans et al., 2000) ; (Pénisson-Besnier et al., 2007)). De nouvelles caractéristiques histologiques apparaissent comme les « Necklace », qui se retrouvent également chez les patients (Bevilacqua et al., 2009), et le remplacement progressif du muscle par du tissu adipeux chez la grande majorité des patientes dans des proportions variables

((Helliwell et al., 1998) ; (Hammans et al., 2000) ; (Jungbluth et al., 2003) ; (Grogan et al., 2005) ; (Pénisson-Besnier et al., 2007)). Enfin la maladie semble progressive dans la population féminine atteinte, car les caractéristiques histologiques augmentent avec le temps (Bevilacqua et al., 2009).

1.1.3 Identification du gène

L'étude de la transmission de la maladie des premiers cas de CNM a permis de restreindre les recherches du gène responsable de la maladie au chromosome X (Bucher et al., 1986). L'utilisation des microsatellites, marqueurs génomiques, dans plusieurs familles consanguines atteintes de CNM a permis de restreindre la région de localisation du gène à une distance de 280kpb ((Starr et al., 1990) ; (Smolenicka et al., 1996) ; (Hu, Laporte, Kioschis et al., 1996) ; (Hu, Laporte, Kress et al., 1996)). En 1996 le gène responsable de la myopathie myotubulaire est séquencé par clonage positionnel de cette région (Laporte et al., 1996). La connaissance de la séquence génique d'*MTM1* a été le point de départ pour un reclassement des CNM et l'étude moléculaire de la maladie.

Le séquençage de la région génomique, l'utilisation des banques d'EST et de la bio-informatique ont permis la caractérisation du gène et de sa protéine (Laporte et al., 1996). Le gène est divisé en 15 exons, précédé par une région génomique de deux kilo bases (kb) contenant le promoteur théorique. Une analyse *in silico* a identifié trois sites de fixation du facteur de transcription Myogénine, qui est spécifique du muscle (Laporte, Guiraud-Chaumeil et al., 1998). La séquence codante de *MTM1* conduit à la synthèse de la myotubularine, une phosphatase identifiée par son site catalytique, (I/V)HCXAGXXR(S/T)G, caractéristique des protéines tyrosine phosphatases. La détection des transcrits dans différents tissus a permis de mettre en évidence un transcrit ubiquitaire de 3.9 kb et un second transcrit de 2.4 kb, uniquement dans le muscle et les testicules (Laporte et al., 1996).

Les mutations et leurs conséquences phénotypiques.

La connaissance de la séquence et de l'organisation du gène MTM1 permet la recherche de mutations dans les exons et les introns chez les patients. La première technique utilisée pour la détection de mutation, est la méthode du « single-strand conformation polymorphism » ou SSCP. Actuellement, les mutations dans les séquences exoniques sont détectées par séquençage de Sanger

ou par la technique de « denaturing high performance liquid chromatography » ou DHPLC, qui permet une détection plus rapide des mutations (Flex et al., 2002). Demain, les mutations pourront être détectées par « deep sequençing » ce qui accélèrera le processus (Laporte, Myologie 2011). Enfin les techniques de diagnostic sont complétées par la détection de la myotubularine dans des cellules ou des biopsies musculaires de patients ((Laporte et al., 2001) ; (Tosch et al., 2010)). Les techniques de diagnostic moléculaire sont également étendues au diagnostic prénatal afin de renforcer la pertinence du conseil génétique (Tanner, Schneider et al., 1999).

Une première étude met en évidence huit mutations chez huit patients ouvrant la voie à la caractérisation des mutations présentes chez les patients (Laporte et al., 1996). Les mutations dans le gène MTM1 sont retrouvées dans des patients de toutes les ethnies dont l'Europe ((de Gouyon et al., 1997) ; (Tanner, Schneider et al., 1999)), le Japon ((Nishino et al., 1998) ; (Tsai et al., 2005)) et l'Amérique du Nord (Herman et al., 2002). Actuellement le site « The human gene mutation database » recense plus de 200 mutations dans le gène *MTM1*.

Les mutations conduisant à une modification du cadre de lecture, un changement d'acide aminé, ou tronquant la protéine, sont en plus grande proportion que les délétions de petits et grands fragments d'ADN génomique, quelque soit l'origine ethnique ((Biancalana et al., 2003) ; (Herman et al., 2002) ; (Tsai et al., 2005)). Le seul point chaud de mutation semble être l'insertion des trois acides aminés FIQ à proximité du site catalytique. Cette mutation est très souvent associée à un phénotype sévère ((Biancalana et al., 2003) ; (Herman et al., 2002) ; (Nishino et al., 1998)). Cependant même si la fréquence d'apparition reste élevée en comparaison des autres types de mutation, elle ne représente que 7,3% du total des mutations ((Biancalana et al., 2003) ; (Laporte et al., 2000)). La grande majorité des mutations provoquent un phénotype sévère et le plus souvent associé à une protéine (Biancalana et al., 2003). De plus l'absence de myotubularine est associée avec un phénotype sévère. Cependant certaines mutations se retrouvent chez des patients atteints de forme sévère et moyenne (Biancalana et al., 2003). Les mutations sont dispersées de façon aléatoire sur le gène (Biancalana et al., 2003), sans vraiment mettre en évidence un site particulier (McEntagart et al., 2002). La relation entre les mutations géniques et la structure tertiaire de la protéine se limite à la corrélation entre leurs positions sur les domaines identifiés en structure secondaire.

L'identification des mutations dans le gène *MTM1* a mis en évidence qu'une même mutation pouvait induire des phénotypes musculaires plus ou moins graves ((McEntagart et al., 2002) ; (Hoffjan et al., 2006)). Cependant la présence de mutations conduisant à une absence de protéine, ou une protéine tronquée, est presque toujours associées à des phénotypes sévères, tandis que des

mutations faux-sens sont associées avec des phénotypes moyens (McEntagart et al., 2002). Ces données, ajoutées à la présence de complications chez certains patients renforcent l'idée de l'existence de facteurs aggravants ou de mécanismes compensatoires.

L'étude parallèle des mutations et de l'histologie des patients a permis de mettre en évidence que des mutations tronquantes, ou provoquant l'absence de la myotubularine, sont très souvent associées à une taille moyenne de myofibres réduites et une durée de vie courte chez les patients, tandis que la présence de mutations faux-sens est associée à une taille moyenne des myofibres plus importante que précédemment et une durée de vie plus importante (Pierson et al., 2007). L'analyse de la taille moyenne des fibres semble être un bon moyen pour affiner le pronostic vital des patients.

1.2 La famille des protéines homologues à la myotubularine

Le gène *MTM1*, est le membre fondateur de la famille des protéines liées à la myotubularine ou MTMR, qui actuellement comprend 15 membres ((Clague et al., 2005) ; (Tosch et al., 2006)), de *MTMR1* à *MTMR14* (Figure 6A). La connaissance de la séquence du gène *MTM1* a permis de découvrir des gènes homologues dans le génome humain. La recherche de gènes orthologues à *MTM1* dans d'autres génomes a mis en évidence une conservation du gène de l'homme jusqu'à la levure (Laporte, Blondeau et al., 1998). Il ne semble pas y avoir de myotubularine chez les procaryotes (Laporte et al., 2003). En revanche les MTMRs sont retrouvées chez certaines plantes ((Ding et al., 2009) ; (Kerk et al., 2010)), champignons et parasites (Kerk et al., 2010). La recherche d'homologues dans les différentes espèces a permis de mettre en évidence l'existence d'un nombre variable de MTMRs selon les espèces. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, un seul gène est présent ((Taylor et al., 2000) ; (Blondeau et al., 2000)), tandis que chez *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*, il existe six membres ((Laporte et al., 2001) ; (Laporte et al., 2003)). Chez *Danio rerio*, douze des quinze myotubularines sont présentes (Dowling et al., 2009) et chez *Mus musculus* 14 sont présentes (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Index). *Homo Sapiens* possède actuellement le plus grand nombre de MTMR.

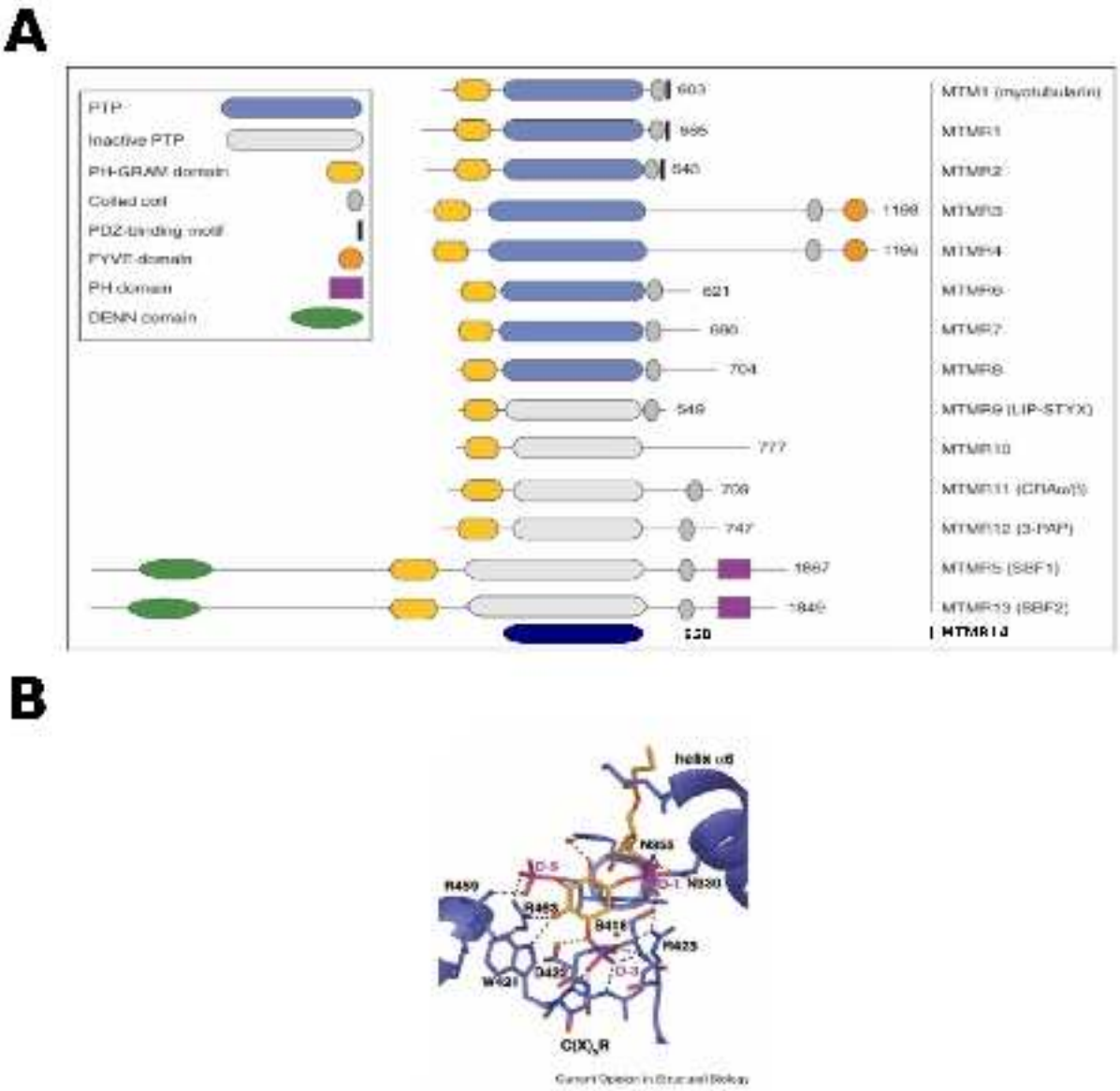


Figure 6 : La famille des protéines associées à la myotubularine.

A/ Les MTMRs possèdent une succession de trois domaines protéiques communs : le domaine PH-GRAM, le domaine catalytique PTP et le domaine « Coiled-Coil ». MTMR14 ne possède que le domaine catalytique PTP. Certaines MTMRs possèdent d'autres domaines additionnels : PDZ, FYVE, PH et DENN. Adapté de Begley 2005. **B/** Structure tridimensionnelle du site catalytique de MTMR2 (Bleu) en complexe avec son substrat le PI3,5P_2 (Jaune). Adapté de Begley 2005 (Begley et al., 2005).

1.2.1 Identité de la famille : le domaine protéine tyrosine phosphatase

La comparaison des séquences d'acides aminés des MTMRs entre-elles révèle la conservation d'un certain nombre d'entre elles au cours de l'évolution ((Laporte et al., 1996) ; (Laporte et al., 2001) ; (Laporte et al., 2003)). La première séquence consensus remarquable comprend les acides aminés CSDGTDR (Figure 6B), et est retrouvée dans le site catalytique des protéines tyrosine phosphatases (PTP) et des protéines à double spécificité (DSP) ((Laporte et al., 2000) ; (Wishart et al., 2001)). Cependant le site actif des MTMRs ne conserve de commun avec ces deux familles de protéines que la séquence CX_5R, mais il se rapproche plus du site catalytique de la phosphatase Sac1p de la levure que des autres protéines tyrosine phosphatases ((Taylor et al., 2000) ; (Wishart et al., 2001) ; (Laporte et al., 2001)).

La comparaison des séquences protéiques des PTP et DSP, montre une identité globale très faible, autour de 5% d'identité de séquence, et c'est la résolution de leur structure tertiaire qui met en évidence des similarités de structure, notamment dans l'organisation du site catalytique. Les éléments divergents du site catalytique semblent permettre la discrimination et la spécificité des substrats. La réaction catalysée par ces enzymes est divisée en deux étapes, qui requièrent la création d'un intermédiaire enzyme-substrat. La première étape est l'attaque nucléophile de la cystéine du site catalytique via son groupement soufre sur le groupement phosphate-substrat et la formation de l'intermédiaire. Un acide aspartique proche du site actif protone l'oxygène du substrat et permet sa libération rapide, sans le groupement phosphate. L'intermédiaire enzyme-phosphate est ensuite hydrolysé par une molécule d'eau et permet une régénération rapide du site actif (Denu et al., 1996).

Le domaine PTP des MTMRs, long de 375 aa (Begley et al., 2005), est beaucoup plus grand que le domaine PTP classique qui varie entre 200-300 aa (Denu et al., 1996). En effet le domaine PTP des MTMRs comprend dans sa partie N-terminale (N-ter) un domaine RID, pour « Rac induced recruitment domain » et dans sa partie C-terminale (C-ter) un domaine SID, pour « SET (Su(var), Enhancer of zeste, Trithorax) interaction domain », tous les deux intégrés au domaine PTP. La résolution de la structure tertiaire de MTMR2 a permis de voir l'agencement du site catalytique ainsi que des différents domaines communs aux MTMRs (Begley et al., 2003). Une seconde étude a permis de caractériser les interactions entre les substrats et le site catalytique de MTMR2 (Begley et al., 2006). Ces études montrent que la poche du site actif des MTMRs est beaucoup plus profonde

que les poches des sites actifs classiques des PTP ((Begley et al., 2005) ; (Begley et al., 2006)). Il possède également une résistance plus importante au stress oxydatif *in vivo* et *in vitro* que d'autres domaines PTP, comme celui de Sac1 (Ross et al., 2007).

La découverte du site actif a également mis en évidence la présence d'une sous population de MTMR. En effet, si l'alignement des séquences met en évidence que toutes les MTMRs possèdent un domaine PTP, il révèle également la présence de variations au niveau du site catalytique. Dans la famille humaine des MTMRs, deux groupes peuvent être distingués par leur site actif. Le groupe des MTMRs actives, c'est-à-dire celles qui possèdent les acides aminés caractéristiques du site catalytique, et les MTMRs inactives, c'est-à-dire, celles qui ne possèdent pas les acides aminés du site catalytique (Laporte et al., 2003). Il s'avère également que les variations retrouvées chez les membres inactifs des MTMRs les rendent bien inactives (Cui et al., 1998).

Les MTMRs possèdent également d'autres domaines retrouvés à la fois chez les MTMRs actives et inactives, qui participent au corps commun des MTMRs. En N-ter de la protéine se trouve un domaine PH-GRAM, suivi d'un domaine RID, du domaine PTP, du domaine SID et enfin en C-ter, d'un domaine « Coiled-Coil » (CC). Ces différents domaines sont constants à toutes les MTMR (Laporte et al., 2003), sauf MTMR14, qui ne possède pour le moment que le domaine PTP (Tosch et al., 2006).

1.2.2 La fonction des MTMRs

Identification des substrats.

La connaissance de la présence de ce site actif a conduit à l'identification des substrats spécifiques des MTMR. Les premières analyses, focalisées sur la déphosphorylation de protéines se sont avérées très faibles, voire inefficaces ((Cui et al., 1998) ; (Laporte et al., 2003) ; (Taylor et al., 2000)). La ressemblance du site actif des MTMRs avec le site actif d'autres phosphatases déphosphorylant des phospholipides (Taylor et al., 2000), et la capacité de la myotubularine d'hydrolyser le para-nitrophénylphosphate (pNPP) (Laporte, Blondeau et al., 1998) ont permis de restreindre la recherche du véritable substrat. Le phosphatidyl-inositol-3-phosphate (PI3P) (figure D2) est le premier substrat mis en évidence *in vitro* et *in vivo* dans des cellules de mammifères (Taylor et al., 2000).

La spécificité de MTM1 pour le PI3P est conservée durant l'évolution et a été mise en évidence

chez les eucaryotes unicellulaires comme la levure (Laporte et al., 2000), et pluricellulaires comme *Danio rerio* (Dowling et al., 2009). Cette spécificité pour le PI3P semble être commune aux différentes familles de MTMRs à travers l'évolution ((Walker et al., 2001) ; (Zhao et al., 2001) ; (Berger et al., 2002) ; (Schaletzky et al., 2003) ; (Mochizuki et al., 2003)). Au fil du temps un deuxième substrat a été identifié, le phosphatidyl-inositol-3,5-bis phosphates (PI3, $5P_2$) (Figure 6B et 7B) et il semble également commun à toutes les MTMRs ((Walker et al., 2001) ; (Zhao et al., 2001) ; (Berger et al., 2002) ; (Schaletzky et al., 2003) ; (Mochizuki et al., 2003)).

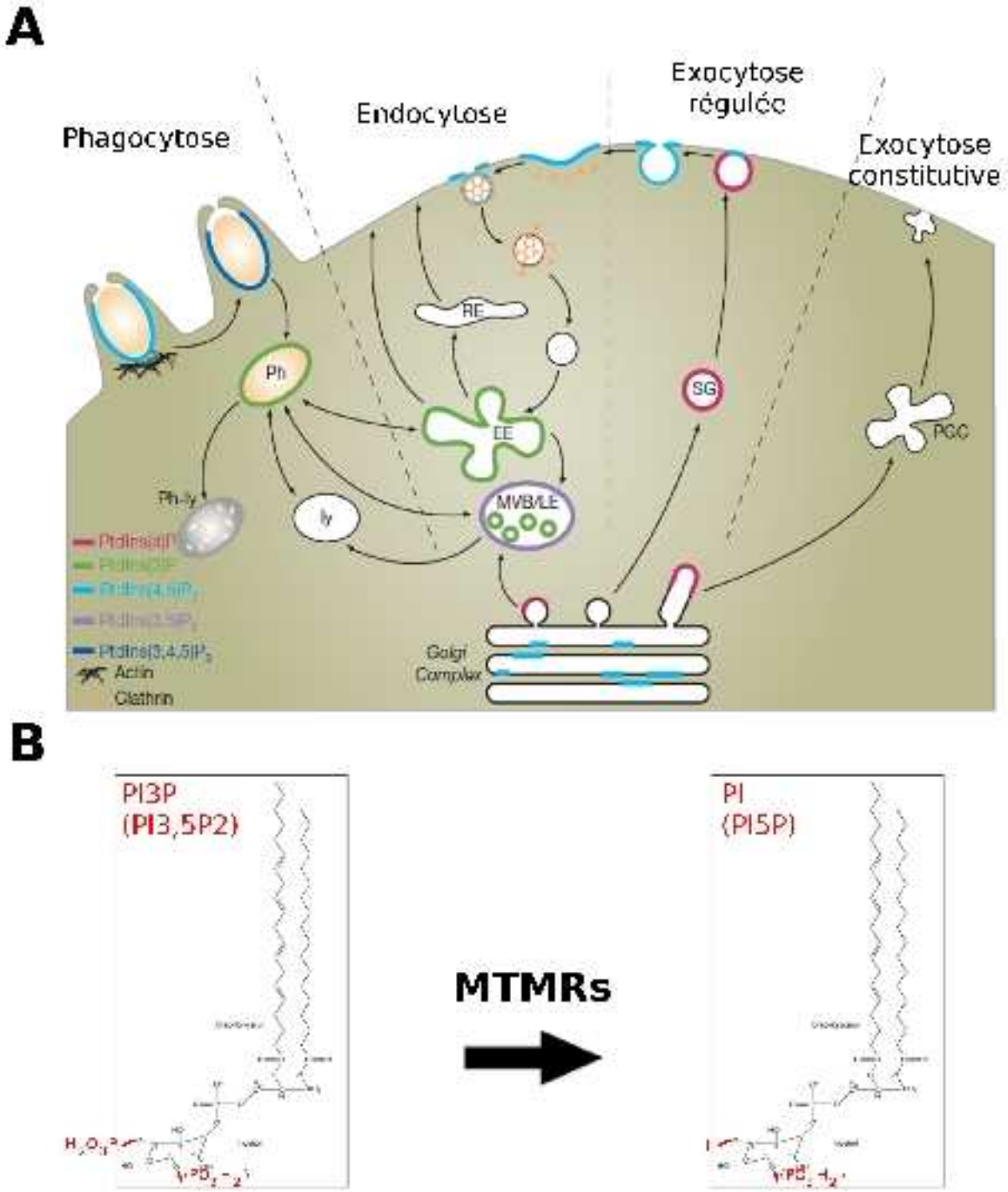


Figure 7 : Les substrats des MTMRs et leur localisation dans la cellule.

A/ Localisation des différents phosphoinositides dans les différentes voies d'endocytose et d'exocytose cellulaires. EE : endosome précoce ; ly : lysosome ; MVB/LE : corps multivésiculaire ou endosome tardif ; Ph : phagosome ; Ph-ly : phago-lysosome ; RE : endosome très précoce ; RG : granule de sécrétion. Adapté de De Matteis NCB 2004 (De Matteis et al., 2004). **B/** Formule bidimensionnelle des deux substrats des MTMRs, le PI3P et le PI3,5P2 et de leurs métabolites le PI et le PI5P. Adapté de Begley 2005 (Begley et al., 2005).

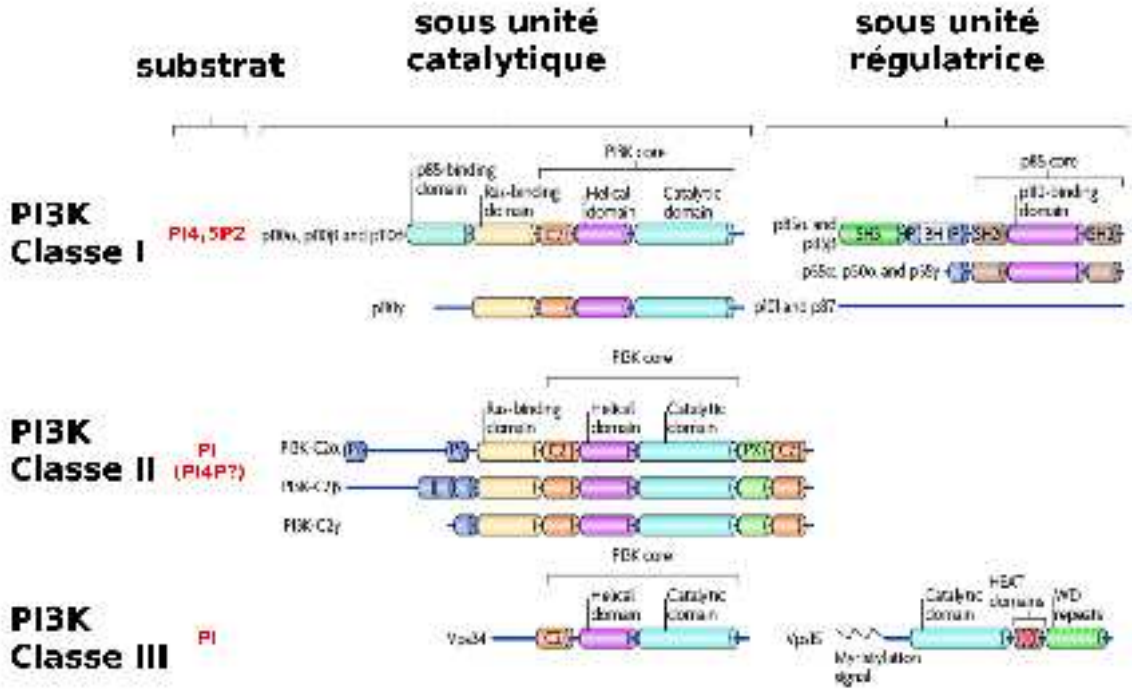


Figure 8 : les différentes kinases qui forment les substrats des MTMRs.

Représentation schématique des trois classes de kinases phosphorylant la position 3 du groupement inositol de différents phosphoinositides. Le PI3P utilisé par la myotubularine semble formé par les classes II et III. Adapté de Vanhaesebroeck 2010 (Vanhaesebroeck et al., 2010).

Le métabolisme des phosphoinositides : naissance et extinction.

Les lipides remplissent des rôles essentiels dans la cellule (Figure 7). Ils permettent l'intégrité de la cellule et participent à la compartimentation des fonctions cellulaires. Parmi les différentes populations de lipides existants, une minorité d'entre eux, environ 10% ((De Matteis et al., 2004) ; (Di Paolo et al., 2006)) du total, remplissent des fonctions essentielles pour la cellule : les phosphoinositides. Le métabolisme des phosphoinositides est régulé par un grand nombre d'enzymes qui agissent sur les différentes positions du groupe inositol. Deux groupes d'enzymes participent à ce métabolisme : les kinases (Figure 8) et les phosphatases (Figure 7). L'interaction entre ces deux populations d'enzymes permet de générer un code qui sert d'identité aux différentes membranes par l'intermédiaire des phosphoinositides. Les MTMRs font partie du groupe des phosphatases et déphosphorylent la position 3 du groupe inositol.

Les phosphoinositides sont composés d'un corps hydrophobe et d'une tête hydrophile. Le corps se compose de deux lipides à longue chaîne carbonée reliés entre eux par un groupement glycérol. La dernière fonction OH du groupement glycérol permet de faire le lien avec la tête du lipide grâce à une liaison phosphodiester. La tête est formée par l'inositol qui va déterminer l'identité de différentes populations de phosphoinositides (Figure 7). Le phosphatidyl-inositol (PI), précurseur de la famille, est synthétisé dans le réticulum endoplasmique et transporté dans les membranes par des vésicules ou des protéines de transfert ((Di Paolo et al., 2006)).Les phosphoinositides sont ensuite générés par phosphorylation et déphosphorylation de certaines positions spécifiques du groupe inositol ((De Matteis et al., 2004) ; (Di Paolo et al., 2006)). En effet les positions D3, D4 et D5 du groupement sont phosphorylées par différentes kinases générant ainsi des phosphoinositol mono-phosphate, des PI bi-phosphates et le phosphatidyl inositol tri-phosphates (PIP_3). Une fois phosphorylés, le mécanisme inverse permet de générer des phophoinositides mono- et bi- phosphate ainsi que de l'inositol ((De Matteis et al., 2004) ; (Di Paolo et al., 2006)).

Les kinases (Figure 8) constituent un groupe de protéines qui permettent d'ajouter un groupement phosphate, provenant de l'ATP à différentes positions du groupement inositol. Un groupe de kinase est spécialisé dans la phosphorylation de la position 3 du phosphatidyl inositol : les phosphatidyl-inositol 3 Kinases (PI3K). Il existe trois classes de kinases chez les mammifères : les PI3K de classe I (PI3K-CI), les PI3K de classe II (PI3K-CII) et les PI3K-CIII de classe III. Ces trois classes de kinases sont retrouvées dans des organismes inférieurs comme *D. melanogaster* et *C. elegans*. En revanche, chez *S. cerevisiae* une seule classe de kinase est retrouvée, c'est la classe III. Les différentes classes de kinases, chez les mammifères, comptent au total huit membres contre

trois pour *C. elegans* et *D. melanogaster* et un pour *S. cerevisiae*. Les kinases sont contrôlées en premier par des sous-unités régulatrices et en second par différentes protéines qui vont gouverner leur fonction, l'activité kinase, et leur localisation. Ces interactions vont permettre un contrôle très précis des kinases en réponse à différents stimuli et également déclencher différents événements à des endroits bien précis ((Sasaki et al., 2009) ; (Vanhaesebroeck et al., 2010)).

Les phosphatases constituent la famille des protéines qui permet d'enlever un groupement phosphate de l'inositol. Plusieurs types de phosphatases existent et elles sont regroupées en famille selon leur séquence protéique.

La famille des phosphatases Sac pour « suppressor of actine », possède trois membres de taille variable mais supérieure à 400 aa. Le motif catalytique CX_5R de Sac1 lui permet de déphosphoryler les positions D3, D4 et ou D5 des PI3P, PI4P et PI3,5P2, tant chez le rat que chez la levure. Cependant elle n'agit pas sur le $PI4,5P_2$ contrairement à son homologue Sac2. Sac1 contrôle l'inhibition de la sécrétion des vésicules du « Trans-Golgi Network », où elle localise, lorsque la cellule est privée de nourriture. Dans ces conditions, Sac1 se lie à COP-II et hydrolyse le PI4P ce qui provoque un arrêt de la sécrétion de vésicules. L'inactivation de Sac1 dans des embryons de souris provoque leur mort rapidement après l'implantation, ce qui prouve le rôle important que joue Sac1 dans l'activité cellulaire de base. Sac2 semble être régulé par l'histone déacétylase-2 (Hdac2) et agir négativement sur la voie d'Akt en contrôlant la vie du $PI3,4,5P_3$ (ou PIP_3). Sac3 remplit un rôle essentiel dans la croissance des neurones en différenciation grâce à son association avec la PIP3K alias PIKfyve pour « phosphoinositide kinase for five position containing a FYVE (Fab1p, YOTB, Vac1p and EEA1) finger ». PIKfyve ajoute un phosphate en position 5 du PI et du PI3P et Sac3 hydrolyse la position 5 du $PI3,5P_2$. De plus, l'interaction de Sac3 avec PIKfyve provoque une activation de la kinase (Sasaki et al., 2009).

La famille des phosphatases PTEN ne compte qu'un seul membre : PTEN pour « phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 ». PTEN déphosphoryle la position 3 du PIP3 grâce à son site catalytique CX5R. Ce PIP3 est formé par les PI3 kinases et sert à réguler l'activation de PDK1. Le mécanisme d'inhibition de l'activation d'Akt par PTEN passe par l'inhibition du fonctionnement de PDK1. PTEN joue le rôle de suppresseur de tumeur en prévenant les activations anarchiques d'Akt. Son rôle est très important car PTEN est le deuxième facteur muté, supprimé ou inhibé dans les cancers chez l'homme (Sasaki et al., 2009).

Le rôle des phosphoinositides dans l'identité membranaire.

L'interaction entre un PI et son effecteur est généralement faible et pour la stabiliser et la renforcer il faut que plusieurs de ces protéines interagissent ensemble. Ce mode de fonctionnement assure une dynamique importante pour la régulation des membranes, de leur formation à leur devenir. L'effecteur reconnaît un type de PI avec une affinité plus ou moins grande suivant le type de domaine protéique dont il dispose. L'interaction débute par une interaction électrostatique de deux types, dans certains cas elle est spécifique et dans d'autres, aspécifique. Dans le premier cas l'interaction peut, ou non, induire un changement dans la conformation de la membrane. Suite à ce changement une partie hydrophobe du module de liaison se fixe dans la membrane augmentant la déformation. Dans le cas de liaison électrostatique aspécifique, le domaine protéique lie le PI et met en place l'interaction hydrophobe avec la membrane. La mise en place de l'interaction hydrophobe va stabiliser le complexe en rendant la reconnaissance domaine-PI spécifique. Dans tous les cas l'association régulière de plusieurs domaines permet une courbure importante de la membrane (De Matteis et al., 2004).

La spécificité entre les domaines protéiques et les PI a permis de les localiser principalement dans la voie de l'endocytose et de l'exocytose (Figure 6A). Le domaine FYVE possède une grande spécificité pour le PI3P. L'association de deux domaines FYVE avec la GFP permet d'obtenir une sonde 2XFYVE, qui met en évidence le PI3P intracellulaire. Le PI3P se retrouve dans plusieurs types d'endosomes : les endosomes précoces, les vésicules internes du MVB et dans les phagosomes matures. La localisation sectorielle et statique du PI3P confère une identité à l'endosome (De Matteis et al., 2004).

L'identité membranaire permet le recrutement de différents types de protéines. Ces protéines interagissent entre elles renforçant la liaison avec la membrane et le recrutement d'autres protéines. Mais elles participent également au changement de l'identité de cette membrane. Les différents complexes protéiques remplissent différentes fonctions biologiques dans le transport de vésicules et la signalisation cellulaire. Parmi les différents effecteurs, trois types essentiels contrôlent le devenir des PI : les kinases, les phosphatases, et les « small GTPases » (sGTPases) et leurs effecteurs. Par exemple au niveau des endosomes précoces Rab5, une sGTPase, se lie au PI3P et recrute EEA1 une protéine qui participe à la fusion des endosomes précoces avec d'autres membranes. Rab5 recrute également Vps34, la PI3K-CIII, durant les premières étapes de la formation des endosomes précoces. Dans le corps multivésiculaire, le PI3P sert de substrat à la formation du PI3, $5P_2$.par la kinase PIKfyve. Ces deux PI sont déphosphorylés par deux familles de phosphatases : la famille de

Sac1 et les MTMRs (De Matteis et al., 2004).

1.2.3 Le rôle des différentes MTMRs

MTMR1.

MTMR1 est peu caractérisée. Elle hydrolyse de PI3P et le PI3, $5P_2$ *in vitro* (Tronchère et al., 2004). MTMR1 est située sur le chromosome X, juste à proximité de MTM1 et résulterait d'une duplication ancestrale de MTM1 (Laporte, Blondeau et al., 1998). Durant le développement musculaire, MTMR1 est exprimée sous plusieurs isoformes (Buj-Bello, Furling at al., 2002). Un défaut d'épissage de ces différentes formes a été mis en évidence chez des patients atteints de dystrophies myotoniques (DM) de type 1 ((Buj-Bello et al., 2002) ; (Santoro et al., 2010)) et 2 (Santoro et al., 2010).

MTMR2.

MTMR2 hydrolyse le PI3P et le PI3, $5P_2$ (Berger et al., 2002). La résolution de la structure tertiaire de la protéine (Begley et al., 2003) avec ses substrats, le PI3P et le PI3, $5P_2$, permet de visualiser le repliement des domaines dans l'espace et l'organisation du site actif (Begley et al., 2005). L'interaction d'MTMR2 avec d'autres protéines lui permet de remplir différentes fonctions.
L'interaction entre le domaine « Coiled-Coil » (Robinson et al., 2005) d'MTMR2 et le même domaine sur MTMR5 (Kim et al., 2003) ou MTMR13 (Laporte et al., 2003) permet la dimérisation des protéines et une augmentation de l'activité catalytique d'MTMR2 ((Kim et al., 2003) ; (Robinson et al., 2005) ; (Berger et al., 2006)).
La phosphorylation de la sérine 58 d'MTMR2 permet de contrôler son activité sur la dégradation du récepteur à l'EGFR (Récepteur au facteur de croissance de l'épiderme) au niveau des endosomes marqués par Rab5 (Berger et al., 2011). En absence de phosphorylation de la sérine 58, l'EGFR reste activé et provoque une activation des voies de signalisation Akt et ERK1/2 (Franklin et al., 2011).
Chez l'homme, MTMR2 est responsable de la neuropathie de Charcot-Marie-Tooth 4B1, qui est une neuropathie des nerfs périphériques. Elle se traduit par une démyélinisation de l'axone des neurones (Bolino et al., 2000). Chez la souris adulte, MTMR2 se localise dans le système nerveux central, la moelle épinière et les nerfs périphériques (Berger et al., 2002). La création d'un modèle délété dans

tout l'organisme pour le gène MTMR2 a permis de reproduire le problème démyélinisation de l'axone des neurones des patients atteints de CMT4B1, mais également de monter un rôle de la protéine dans la spermatogenèse ((Bolino et al., 2004) ; (Bonneick et al., 2005)). Un deuxième modèle animal délèté pour MTMR2 uniquement dans les cellules de Schwann a prouvé son rôle dans le défaut de myélinisation des axones (Bolis et al., 2005). Ces deux modèles ont également permis de mettre en évidence l'action de MTMR2 dans la régulation négative de la formation de la gaine de myéline (Bolis et al., 2009). Pour remplir son rôle MTMR2 agit avec d'autres partenaires comme le neurofilament-L (NF-L) (Previtali et al., 2003) et le complexe Dlg1, Sec8 et Kif13 (Bolis et al., 2009). L'interaction entre MTMR2 et les NF-L ne se fait que lorsque MTMR13 est présent. L'absence d'un des deux membres provoque l'agrégation des NF-L (Goryunov et al., 2008). Le tandem MTMR2/MTMR13 joue un rôle important et spécifique dans la myélinisation. MTMR13 est exprimé dans les nerfs sciatiques, la moelle épinière et la colonne vertébrale (Azzedine et al., 2003). MTMR13 est retrouvé muté chez des patients atteints de la neuropathie de Charcot-Marie-Tooth de type (CMT) 4B2 (Senderek et al., 2003) et le modèle murin déficient en MTMR13 reproduit la démyélinisation des axones et l'atteinte neurologique de CMT. MTMR2 contrôle négativement l'apport de membrane lors de l'enroulement des cellules de Schwann autour de l'axone en modulant l'activité du complexe Dlg1/Sec8/kif13 (Bolis et al., 2009).

L'identification de mutations chez les patients et leur recensement sur la structure tertiaire de MTMR2 ont montré une répartition principalement interne et près du site catalytique. L'étude de ces mutants a permis de mettre en évidence que l'abolition de l'activité catalytique de la protéine, soit par déformation du site catalytique ou de la structure tertiaire, était responsable de la maladie (Begley et al., 2003).

L'ablation de MTMR5 chez la souris provoque une infertilité chez les mâles. La spermatogenèse des souris mutantes est altérée au niveau de la première vague de formation. La déficience en maturation conduit à une azoospermie (Firestein et al., 2001). MTMR5 confère à MTMR2 un rôle biologique spécifique.

MTMR3 et 4.

MTMR3 possède un spectre de substrats beaucoup plus important que les autres myotubularines. En effet, MTMR3 est capable d'hydrolyser des peptides contenant des phospho-sérine, -thréonine et -tyrosine *in vitro* (Zhao et al., 2000). MTMR3 hydrolyse, *in vitro* et dans la levure, le PI3P et PI3, $5P_2$, et forme du PI5P ((Walker et al., 2001) ; (Lorenzo et al., 2005)). Le

remplacement de la cystéine catalytique par une sérine abolit l'activité catalytique (Zhao et al., 2000). L'abolition de l'activité catalytique, provoque une localisation de MTMR3 au niveau du Golgi (Lorenzo et al., 2005). Chez C*aenorhabditis elegans*, mtm3 (homologue de MTMR3 humain) hydrolyse également le PI3P et le PI3, $5P_2$, ce qui permet de contrôler la durée de vie de l'animal et ses mouvements lorsqu'il atteint sa maturité sexuelle (Ma et al., 2008). Dans les cellules de mammifères, MTMR3 agit sur les autophagosomes naissant pour réguler leur quantité et leur taille, en contrôlant un groupe de PI3P généré par des PI3-kinases (Taguchi-Atarashi et al., 2010). MTMR3 interagit avec MTMR4 (Lorenzo et al., 2006).

MTMR4 déphosphoryle le PI3P *in vitro* (Zhao et al., 2001) et *in cellulo* (Naughtin et al., 2010). MTMR4 inhibe la voie du TGF-β dans les endosomes précoces. En effet MTMR4, dépendant de son activité phosphatase, séquestre phospho-R-smad3 aux endosomes précoces, l'empêchant d'aller dans le noyau et d'activer la transcription de gènes cibles (Yu et al., 2010). MTMR4 se localise dans les endosomes précoces mais également dans les endosomes tardifs et de recyclage, où il participe à la localisation de Rab11 et de VAMP3 (Naughtin et al., 2010). Aux endosomes tardifs, MTMR4 interagit également avec Nedd4, une ubiquitine ligase, via une interaction de son domaine PY avec le domaine WW de Nedd4. Dans un muscle atrophié, la concentration de Nedd4 augmente et entraine une réduction de la concentration de MTMR4 par ubiquitination (Plant et al., 2009).

MTMR6, 7 et 8.

MTMR6, MTMR7 et MTMR8 sont regroupés ensemble d'un point de vue phylogénétique ((Laporte et al., 2003) ; (Xue et al., 2003)). Ils interagissent tous les trois avec MTMR9, une MTMR inactive (Lorenzo et al., 2006).

L'interaction entre MTMR6 et MTMR9 augmente l'activité catalytique de ce dernier et renforce son rôle dans la résistance à l'apoptose induite par l'étoposide. L'activité phosphatase de MTMR6 est renforcée en présence de phosphatidylsérine ou de PI5P ((Zou et al., 2009) ; (Schaletzky et al., 2003)).

Chez *C. elegans*, l'ablation de *mtm6* (homologue de MTMR6) contre balance la létalité induite par des mutations dans let512 (homologue de Vps34 une PI4-Kinase). MTM6 est exprimé dans les mêmes cellules que let512, au niveau de la surface apicale, où il déphosphoryle le PI3P. L'ablation de MTM6 permet également de restaurer légèrement le défaut d'endocytose des celoemocytes (Xue et al., 2003). MTM6 est impliqué dans la phase précoce d'endocytose dans les celoemocytes, où il interagit avec ARF6, RME-1 et MTM9 (homologue de MTMR9 humain) pour hydrolyser le PI3P

(Dang et al., 2004). Toujours chez *C. elegans*, MTM6, en coopération avec MTM9, régule plusieurs fonctions de la voie de signalisation Wnt dont le recyclage du récepteur MIG14/Wls en interagissant avec le complexe kinase vps34/vps15 (Silhankova et al., 2010). Cette fonction, dépendante d'MTM6, est conservée chez *D. melanogaster* (Silhankova et al., 2010).

Chez *C. elegans*, MTM6 interagit également avec le canal potassium dépendant du calcium Kca3.1. L'interaction entre MTM6 et le canal, grâce à leur domaine « Coiled-Coil », permet à MTM6 d'hydrolyser une population de PI3P qui est impliquée dans l'ouverture du canal (Srivastava et al., 2005). Chez l'homme, cette interaction est conservée et permet d'inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD4 naïfs ou mémoires, ce qui permet d'éviter une activation aspécifique de ces lymphocytes (Srivastava et al., 2006).

MTMR7 est peu caractérisée. Elle hydrolyse le PI3P, mais semble préférer l'inositol-1,3-bis phosphate soluble et elle interagit avec MTMR9 via le domaine « Coiled-Coil » (Mochizuki et al., 2003).

Chez la souris, elle est localisée exclusivement dans le cerveau (Mochizuki et al., 2003) avec MTMR9 et MTMR6. Les trois protéines semblent avoir un rôle dans la régulation de différentes hormones impliquées dans la prise de nourriture (Yanagiya et al., 2007).

MTMR9 semble également être un gène candidat pour des maladies comme l'épilepsie (Baulac et al., 2008), comme facteur aggravant des syndromes métaboliques (Hotta et al., 2011) et comme pronostic potentiel d'adénocarcinome de l'œsophage (Goh et al., 2011).

MTMR8 est également peu caractérisée. Chez *D. rerio*, l'inhibition de Mtmr8 par morpholino induit un retard de croissance et une réduction de la taille de la tête et du corps de l'animal de façon dose dépendante. Mtmr8 régule négativement Akt par l'intermédiaire de son domaine PH-GRAM. Le mutant Mtmr8 présente également une désorganisation du réseau d'actine musculaire. Mtmr8 interagit avec la nexiline dans l'organisation du réseau d'actine. Il intervient également dans la voie de signalisation de Sonic Hedgehog (SHH). Mtmr8 est régulée par SHH et permet l'intégration du signal dans les cellules (Mei et al., 2009).

MTMR14.

Contrairement aux autres MTMRs, MTMR14 (ou Jumpy) ne possède de commun avec les MTMRs que le domaine PTP et elle n'est conservée au cours de l'évolution que chez les plantes, les nématodes et les champignons. *In vitro*, MTMR14 déphosphoryle le PI3P et le PI3, $5P_2$ et *ex vivo* le PI3P ((Tosch et al., 2006) ; (Shen et al., 2009)). Elle semble également capable d'hydrolyser le

PI5P, le PI3, $4P_2$ et le PI4, $5P_2$ (Shen et al., 2009). MTMR14 inhibe l'autophagie dans les macrophages et les cellules C_2C_{12} en régulant le PI3P qui se situe sur les membranes des autophagosomes, ce qui a pour conséquence de réguler la fixation de certains acteurs comme WIPI-1α (Vergne et al., 2009). Chez *Danio rerio*, MTMR14, grâce à son activité phosphatase, régule l'excitation-contraction musculaire sans toucher à la structure générale du muscle, mais en provoquant un grossissement anormal du réticulum sarcoplasmique de la triade (Dowling et al., 2010). Chez la souris, MTMR14 contrôle l'accumulation du PI3, $5P_2$ dans le SR. Son augmentation dans ce compartiment rend le récepteur à la ryanodine 1 (RYR1) beaucoup plus sensible à une activation et altère le contrôle de l'excitation-contraction (Shen et al., 2009). Les caractéristiques pathologiques des souris déficientes en MTMR14 sont retrouvées dans des souris normales mais très âgées, où l'expression MTMR14 est réduite. Le phénomène de sarcopénie est retrouvé chez des sujets humains âgés et de ce fait le modèle murin déficient en MTMR14 peut permettre le développement de traitements (Romero-Suarez et al., 2010). Chez l'homme des mutations à l'état hétérozygote ont été retrouvées chez des patients atteints de forme sporadique de myopathie centronucléaire (Tosch et al., 2006).

MTMR12 ou 3-PAP interagit avec MTM1 et MTMR2 ((Nandurkar et al., 2003) ; (Lorenzo et al., 2006)) mais également avec elle même (Lorenzo et al., 2006). MTMR12 est la seule phosphatase prédite comme inactive et dont l'inactivité a été prouvée (Nandurkar et al., 2001). MTMR12 est exprimée fortement dans le cerveau, le cœur, le rein, le foie, le placenta, le poumon et le muscle squelettique sous la forme d'un transcrit de 5,5 kb. Un transcrit de 2.5 kb est exprimé faiblement dans tous les tissus (Nandurkar et al., 2001). MTMR12 interagit avec MTM1 grâce à son domaine SID et permet la localisation de MTM1 dans le cytoplasme et dans des vésicules internes (Nandurkar et al., 2003). MTMR12 a été identifiée comme gène candidat dans la schizophrénie (Ritter et al., 2012).

1.3 La myotubularine

1.3.1 *Ses substrats*

MTM1 comme tous les membres de la famille des MTMR est capable d'hydrolyser *in vitro* le PI3P ((Taylor et al., 2000) ; (Blondeau et al., 2000)) et le PI3, $5P_2$ (Schaletzky et al., 2003). La spécificité pour le PI3P et le PI3, $5P_2$ est conservée *in vivo* et au cours de l'évolution. L'homologue d'MTM1 chez *Saccharomyces cerevisiae* est capable d'hydrolyser le PI3P, *in vitro* (Taylor et al., 2000), tout comme chez *Caenorhabditis elegans* (Neukomm et al., 2011). L'homologue de MTM1 chez *Arabidopsis thaliana* est également capable d'hydrolyser *in vitro* le PI3P et le PI3, $5P_2$ (Ding et al., 2009).

La myotubularine métabolise différentes populations de PI3P et de PI3, $5P_2$ dans plusieurs endroits cellulaires ce qui lui permet d'accomplir différents rôles biologiques *in vivo*.

Ex vivo dans les cellules HEK293, la variation de l'activité phosphatase de la myotubularine provoque des variations de la quantité globale de PI3P (Taylor et al., 2000). La surexpression de la myotubularine dans des myotubes humains ou murins induit également une diminution du PI3P (Chaussade et al., 2003), tandis que sa délétion, dans des cellules HeLa ou des macrophages humains, provoque une augmentation du PI3P ((Razidlo et al., 2011) ; (Kelley et al., 2004)). La délétion ou la surexpression de la myotubularine dans des myoblastes murins provoque une variation de la quantité globale de PI3, $5P_2$ (Hnia et al., 2011). La surexpression d'un mutant inactif de la myotubularine dans des myoblastes induit également une augmentation du PI3, $5P_2$ (Tronchère et al., 2004). Dans les cellules DHK la myotubularine se localise sur des endosomes précoces marqués par Rab5, EEA1 ou tardifs marqués par Rab7. MTM1, en métabolisant différentes populations de PI3P sur ces endosomes, participe à la régulation du nombre de ces endosomes, mais également au recrutement de différents complexes protéiques et/ou la modulation de leurs activités, comme le complexe PI-3-kinase hVps34/hVps15 (Cao et al., 2007). L'action de la myotubularine dans différents endroits de l'endocytose lui permet d'inhiber la dégradation du récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGFR) grâce à son activité phosphatase sur le PI3P contenus dans les endosomes et son domaine PH-GRAM (Tsujita et al., 2004). La myotubularine joue un rôle anti-apoptotique dans la voie Akt en agissant au niveau de la phosphorylation du récepteur lorsqu'il est endocyté grâce à son activité phosphatase. La réduction du PI3P, qui est généré spécifiquement par la PI3KIIb, sur les endosomes contenant le récepteur Akt va réduire sa phosphorylation et entraîner

une réduction de l'activation du récepteur et de la voie de l'apoptose par les caspases 7 et 9 et la protéine PARP (Razidlo et al., 2011). Des expériences d'endocytose de *Mycobacterium avium* ont permis de montrer que la myotubularine agit dans certaines voies d'endocytose et à des endroits bien déterminés (Kelley et al., 2004).

Chez la levure, la délétion du gène homologue à *MTM1*, *Ymr1*, provoque une augmentation de la quantité totale de PI3P ((Taylor et al., 2000) ; (Blondeau et al., 2000)) et une faible augmentation du PI3, $5P_2$ ((Blondeau et al., 2000) ; (Parrish et al., 2004)). En revanche la surexpression de MTM1 actif entraîne une faible diminution du PI3P (Parrish et al., 2004). L'augmentation de l'activité phosphatase de la myotubularine, chez la levure provoque l'apparition d'une vacuole, un phénomène également observé en absence d'activité kinase de Vps34 (Blondeau et al., 2000). L'ablation de l'activité phosphatase de la myotubularine ne provoque pas d'apparition de vacuole ((Taylor et al., 2000) ; (Blondeau et al., 2000)), mais un problème de recyclage de certaines protéines (Parrish et al., 2004).

Chez *Caenorhabditis elegans*, la délétion ou la présence de mutations inactivatrices du gène *mtm1*, entraîne également une augmentation du PI3P localisé sur des vésicules intracellulaires ((Zou et al., 2009) ; (Neukomm et al., 2011)). MTM1 joue un rôle dans l'endocytose en régulant négativement l'endocytose des corps cellulaires apoptotiques (CCA) dans les celeomocytes. En effet, l'ablation de la myotubularine permet l'accélération de l'endocytose des CCA chez l'animal contrôle et chez le mutant ced1/6/7, l'absence de myotubularine corrige le défaut d'endocytose. MTM1 remplit sa fonction à la membrane plasmique, où il déphosphoryle le PI3P provenant des PI3K de classe II et III et parallèlement au complexe ced2/5/10/12 également impliqué dans l'endocytose. Cette fonction lui est propre car l'ablation des autres MTMRs n'a aucun effet sur l'endocytose des CCA.

La fonction de MTM1 est également spécifique aux celeomocytes puisque son ablation des cellules responsables de la migration à l'extrémité des gonades, n'a aucun effet sur la migration cellulaire (Zou, Lu et al., 2009).

Chez *Drosophila melanogaster*, la myotubularine contrôle le métabolisme de différentes populations de PI3P localisées au niveau des endosomes et formées par la PI3KCII et ou la PI3KCIII. Ces modulations locales de PI3P permettent de contrôler la taille des endosomes tardifs et des lysosomes ainsi que les filopodes membraires nécessaires à la migration des vésicules entre ces deux organelles (Velichkova et al., 2010). Le contrôle du PI3P au niveau de la membrane plasmique permet une régulation de l'organisation des microtubules, ce qui influence la formation des filopodes nécessaires à la migration des hémocytes (Velichkova et al., 2010). Au niveau de

l'animal, l'hydrolyse par la myotubularine de PI3P formée par la PI3KC-II permet de contrôler la survie des larves de drosophile ((Velichkova et al., 2010) ; (Ribeiro et al., 2011)).

Chez *Danio rerio*, la délétion de la myotubularine dans l'ensemble de l'organisme n'entraîne pas d'augmentation de la quantité générale de PI3P, mais provoque une accumulation de PI3P autour des noyaux musculaires (Dowling et al., 2009).

La myotubularine remplit certaines fonctions biologiques grâce au PI5P qui est le produit de la catalyse du PI3, $5P_2$. Le PI5P exerce sur les MTMRs la fonction d'activateur allostérique. L'addition de PI5P dans les tests d'activité catalytique de la myotubularine et d'autres MTMRs provoque une augmentation importante de l'activité catalytique. Le PI5P en interagissant avec le domaine PH-GRAM de la myotubularine provoque son oligomérisation en heptamère, ce qui la rend beaucoup plus active (Schaletzky et al., 2003). Chez *Arabidopsis thaliana*, la formation de PI5P par la myotubularine permet de séquestrer ATX1 de façon dose dépendante. Ce mécanisme est vital pour la survie de la plante durant les périodes de sècheresse (Ndamukong et al., 2010).

Enfin MTM1 possède également un rôle biologique indépendant de son activité phosphatase. Il s'agit de son rôle dans la solubilité de la desmine. L'interaction se fait par son domaine RID *in vitro* et *in vivo*. Cette interaction semble avoir pour conséquence une désorganisation des mitochondries et une réduction de leur activité métabolique (Hnia et al., 2011).

1.3.2 Le rôle de la myotubularine dans le muscle

La myotubularine remplit une fonction biologique importante dans le muscle squelettique. L'ablation de la myotubularine depuis la drosophile jusqu'à l'Homme provoque une réduction de la durée de vie des individus et un phénotype musculaire. Parmi les différentes espèces, la mortalité des individus apparaît lors de la transition vers le stade adulte. L'atteinte du muscle se traduit par une désorganisation des fibres musculaires et un arrêt de son fonctionnement. Les myofibres sont désorganisées et le muscle ne se contracte plus. Le phénotype musculaire progresse de façon inverse à la réduction de la durée de vie.

Les rôles de la myotubularine dans le muscle de drosophile.

Chez la drosophile dépourvue de myotubularine, une grande partie des larves meurent au stade pharate qui est le stade de transition entre la larve et l'adulte (Ribeiro et al., 2011). Les survivants ne peuvent plus voler car les muscles ne se contractent plus. La structure des myofibres

est altérée. Les myofibrilles et les noyaux ne sont plus alignés comme dans le muscle sain. En revanche, les mitochondries ne présentent pas d'altération structurelle. Les T-tubules sont longitudinaux et dépourvus des deux marqueurs spécifiques, Dlg1 et l'amphiphysine qui normalement sont présents dans les T-tubules (Ribeiro et al., 2011).

La désorganisation des myofibres est due à une altération de la redistribution des βPS intégrines, lors de la fin du stade pharate. Dans un organisme normal, les intégrines qui participent au maintien des tendons musculaires, sont endocytées pour permettre la réorganisation des costamères. L'absence de myotubularine provoque une rétention des intégrines dans des vésicules d'endocytose cytoplasmiques. Chez les patients atteints de myopathie myotubulaire, l'immunodétection des intégrines sur des coupes histologiques musculaires révèle l'accumulation des intégrines dans le cytoplasme (Ribeiro et al., 2011).

Les rôles de la myotubularine dans le muscle du poisson.

Chez *Danio rerio*, l'absence de myotubularine provoque un retard dans le développement de l'embryon après un jour post fertilisation (Figure 9A). L'atteinte est progressive car à trois jours la queue de l'embryon est incurvée, ce qui traduit généralement une atteinte musculaire. Durant la phase finale de maturation de l'embryon, les muscles ne se contractent pas spontanément (Figure 9A). L'adulte présente une perte de fonction musculaire puisqu'il nage peu ou pas du tout, ni de façon spontanée, ni après stimulation (Dowling et al., 2009).

L'analyse de la structure musculaire chez le mutant, normalement établie à 72 heures, montre une désorganisation par rapport au muscle contrôle. Les fibres musculaires sont de petite taille et présentent une internalisation des noyaux élevée par rapport aux muscles contrôles. Les noyaux sont de grande taille avec nucléole anormal (Figure 9B). Autour des noyaux, les mitochondries sont anormales, les myofibrilles désorganisées. Des zones dépourvues de toutes organelles apparaissent également autour des noyaux. L'ultrastructure révèle la présence de vésicules remplies de matériaux divers ou d'autres constituées de membranes repliées sur elles-mêmes (Figure 9C). Aucune vacuole n'est visible dans la fibre musculaire. Le T-tubule et le SR, constituants de la triade musculaire, sont désorganisés, voir parfois complètement absents. L'utilisation de la technique du patch clamp sur myofibres *in vivo* enregistre un signal de dépolarisation après stimulation de la queue de l'animal. Ces données confirment que l'atteinte est exclusivement musculaire. Cette technique permet également de tester la contraction musculaire et les fibres dépourvues de myotubularine répondent uniquement à des stimulations de faible fréquence (Dowling et al., 2009).

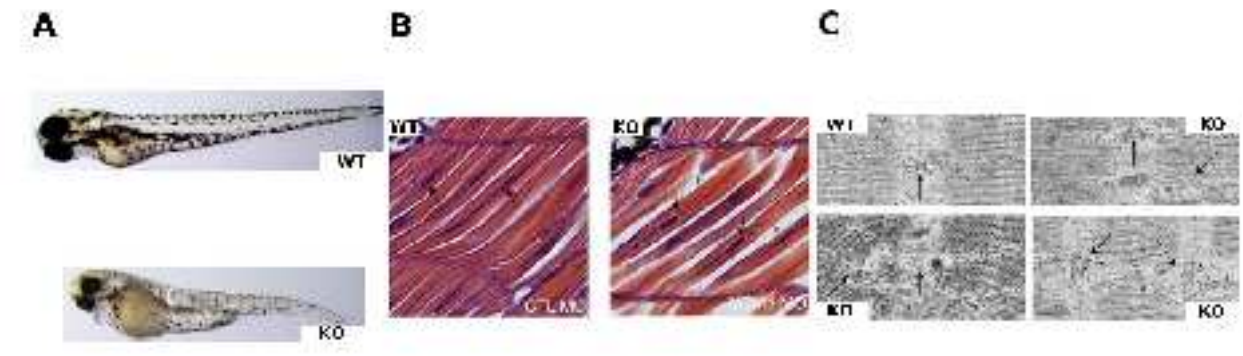


Figure 9 : Phénotype physiologique et histologique dans le modèle poisson de la myopathie myotubulaire.

A/ Phénotype du modèle *Danio rerio* (KO) de la myopathie myotubulaire 72 heures post fertilisation en comparaison de l'animal normal (WT). Parenthèse blanche : problème de développement musculaire. **B/** Coupe longitudinale de muscle colorée à l'hématoxiline-éosine provenant du poisson mutant (KO) et normal (WT). Les flèches désignent les noyaux. **C/** Électron microgramme de triade musculaire provenant de muscle squelettique contrôle (WT) et malade (KO). Les flèches désignent la triade. Adapté de Dowling 2009 (Dowling et al., 2009).

Les rôles de la myotubularine dans le muscle de la souris.

Chez *Mus musculus*, l'ablation de la myotubularine par la technologie de la recombinase Cre provoque la myopathie myotubulaire. Les souris ont une durée de vie courte, 7 semaines en moyenne et jusqu'à 9 semaines au maximum. La naissance des mutants dans une proportion inférieure au ratio mendélien prévu, suppose que l'atteinte musculaire démarre *in utero* pour les cas les plus graves.

L'apparition des symptômes musculaires est plus ou moins rapide selon les individus mais permet néanmoins l'identification de quatre phases distinctes. Quatre semaines après la naissance, les souris mutantes délétées pour MTM1 montrent une phase asymptomatique bien qu'elles soient légèrement plus petites que les contrôles à partir de 15 jours (Figure 10A). L'histologie du muscle est très largement normale. Les fibres musculaires présentes sont de grande taille avec des noyaux périphériques. La structure interne montre des myofibrilles organisées et des mitochondries réparties de façon homogène dans la fibre. La structure est identique au muscle contrôle (Buj-Bello et al., 2002).

L'atteinte musculaire s'aggrave durant la phase II et passe par la paralysie des muscles postérieurs,

accompagnée par une perte de force des muscles antérieurs. La croissance des souris ralentit de façon beaucoup plus importante par rapport aux souris contrôles, essentiellement à cause d'une perte de masse musculaire. Durant la phase III, la paralysie gagne les muscles antérieurs réduisant la force globale de moitié. Le poids des mutants stagne et les souris ont le dos voûté. En phase terminale, les souris sont d'une maigreur cadavérique et perdent du poids de façon importante. Elles sont complètement paralysées et elles suffoquent (Buj-Bello et al., 2002).

Durant la progression de la maladie, les fibres musculaires vont réduire en taille (Figure 10A). Les noyaux passent d'une position périphérique vers une position centrale, dans des proportions variables selon le muscle. Bien que les noyaux soient centraux, il n'y a ni foyer inflammatoire, ni fibrose (Figure 10B). Les mitochondries s'accumulent à la périphérie ou au centre de la myofibre, produisant une couronne vide dans la fibre (Figure 10B). Le réseau de myofibrilles est regroupé à la périphérie de la fibre et des vacuoles vides apparaissent progressivement (Figure 10B ; (Buj-Bello et al., 2002)). Au niveau ultrastructurel, le sarcomère est désorganisé et par endroit la ligne Z disparaît (Buj-Bello et al., 2002). La différenciation musculaire se poursuit durant la progression de la maladie bien que des marqueurs fœtaux persistent. La délétion de la myotubularine spécifiquement dans le système nerveux ne provoque pas de myopathie myotubulaire (Buj-Bello et al., 2002).

Deux modèles de souris atteintes de myopathie myotubulaire ont été générés : un mutant muscle spécifique et un mutant constitutif. Dans le premier cas, la myotubularine est absente spécifiquement dans le muscle squelettique et dans le second cas, la myotubularine est absente dans l'ensemble de l'organisme. L'étude des deux modèles, de fonds génétiques différents, révèle une légère aggravation du phénotype pour le modèle constitutif. La durée de vie des souris est raccourcie et l'histologie du muscle révèle la présence de « Necklace », un regroupement des mitochondries en forme de cercle à proximité du sarcolemme et qui contient un noyau cellulaire (Buj-Bello et al., 2008).

L'étude du modèle mutant constitutif a permis de mettre en évidence la présence d'une proportion de T-tubules longitudinaux anormalement élevée par rapport au muscle normal et qui augmente avec le développement de la maladie (Figure 10C). L'expression de différents constituants des récepteurs DHPR1 et RYR1 est dérégulée dans le muscle malade. L'étude approfondie du fonctionnement de la triade révèle que seul le récepteur DHPR1 s'active de façon moindre par rapport au récepteur provenant du muscle normal en réponse à l'influx nerveux (Al-Qusairi et al, 2009).

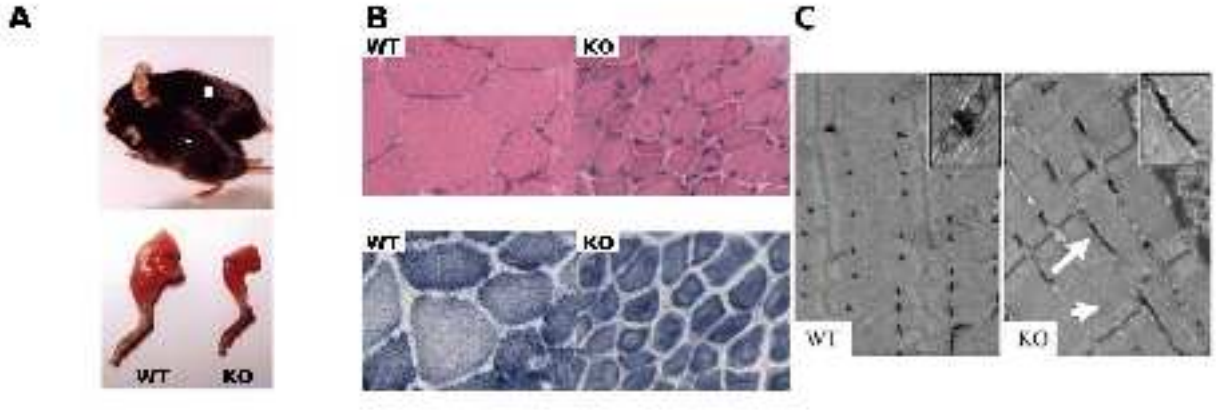


Figure 10 : Phénotype physiologique et histologique du modèle murin de la myopathie myotubulaire.

A/ Image du haut : Phénotype du modèle murin de la myopathie myotubulaire (KO = étoile blanche) en comparaison des souris contrôles au même âge (WT : carré blanc). Image du bas : musculature des pattes arrières provenant de la souris malade (KO) en comparaison de l'animal normal (WT). Adapté de Buj-Bello 2002 (Buj-Bello et al., 2002). **B/** Images du haut : coupes transversales de muscle colorées à l'hématoxyline-éosine provenant de souris mutantes (KO) et contrôles. Image du haut : Coupes transversales de muscle colorées au NADH-TR provenant de souris mutantes (KO) et contrôles (WT). Cette thèse. **C/** Electron micrographe de l'ultrastructure d'une myofibre traitée pour mettre en évidence les tubules transverses (flèche blanche) provenant de muscles de souris malades (KO) et contrôles (WT). Adapté de Al Qusairi 2009 (Al-Qusairi et al, 2009).

Les rôles de la myotubularine dans le muscle du chien.

Le modèle canin de la myoathie myotubulaire a été isolé dans un élevage et résulte d'une mutation transformant l'asparagine 155 en lysine dans la myotubularine canine. Les chiens atteints ont une durée de vie réduite à 26 semaines. L'atteinte musculaire est progressive et débute entre la dixième et la dix-neuvième semaine. La progression la plus courte de la maladie est de 4 semaines. L'atteinte musculaire est progressive et résulte d'une atrophie musculaire (Figure 11A). L'histologie musculaire révèle la présence de fibres de taille très petite avec une prédominance des fibres de type I. La proportion de noyaux internalisés est variable selon le type de muscle et n'excède pas 37%. Les fibres musculaires sont désorganisées (Figure 11B). Les mitochondries et le RE forment des « Necklaces » à la périphérie de la fibre ou des agrégats au centre (Figure 11B). En microscopie électronique la structure de la triade est désorganisée (Figure 11C) et la co-localisation normale des deux marqueurs RYR1, pour la partie SR, et DHPR, pour le T-tubule, est abolie. L'ultrastructure des

myofibres révèle également la désorganisation des mitochondries, des myofibrilles et la présence d'accumulation de membranes en forme de spirale, proches de celles observées chez le mutant de la drosophile. L'analyse de l'expression de la protéine dans le muscle mutant montre que la mutation provoque la disparition de la protéine. De plus, la surexpression de l'allèle mutant dans des cellules orthologues montre qu'elle est dégradée. Dans le muscle contrôle, la myotubularine colocalise avec le DHPR, tandis que chez le mutant les deux protéines ne colocalisent plus. La détection de la myotubularine dans le muscle mutant reste cependant à prendre avec prudence puisque les expériences tendent à montrer que la protéine est dégradée (Beggs et al., 2010).

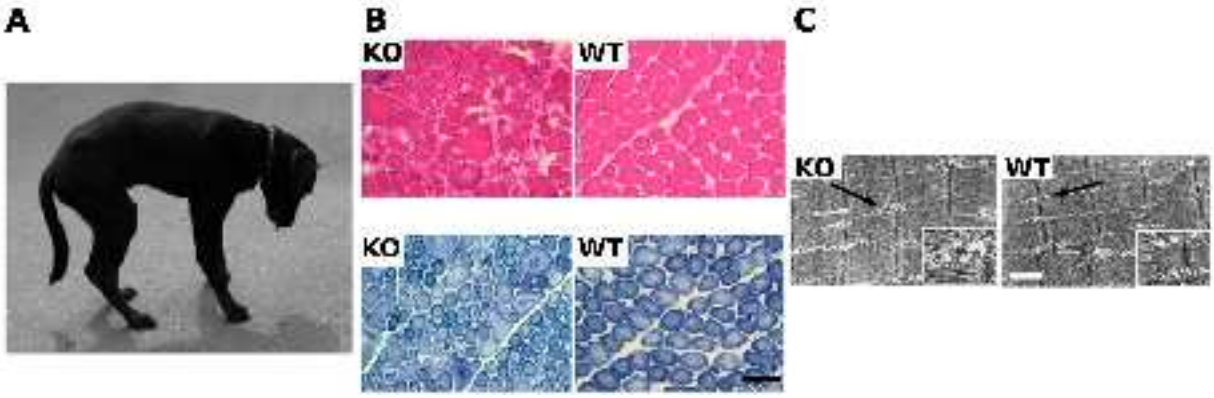


Figure 11 : Phénotype physiologique et histologique du modèle canin de la myopathie myotubulaire.

A/ Phénotype du modèle canin de la myopathie myotubulaire (KO). **B/** Images du haut : coupes transversales de muscle colorées à l'hématoxyline-éosine provenant de chiens mutants (KO) et contrôles (WT). Images du bas : coupes transversales de muscle colorées au NADH-TR provenant de chiens mutants (KO) et (WT). **C/** Électron micrographe de l'ultra structure d'une fibre musculaire avec agrandissement de la structure de la triade (flèche). Adapté de Beggs 2010 (Beggs et al., 2010).

1.4 La thérapie génique

La découverte et la caractérisation de maladies complexes telles que la maladie de Parkinson, le diabète, les cancers ou encore les maladies mono-géniques ont démontré les limites d'action des traitements pharmacologiques. La capacité d'une molécule à remplacer la ou les fonctions d'une protéine défectueuse ou absente est très réduite. Les molécules thérapeutiques simples possèdent en général un spectre d'activité peu spécifique d'un organe ce qui engendre des effets secondaires indésirables.

La limitation de ces thérapies due à un manque de spécificité tissulaire favorise le développement de thérapies plus complexes mais beaucoup plus ciblées, dont la thérapie génique. Très rapidement le concept de transfert de gènes pour remplacer celui qui est défectueux émerge de façon attrayante. Mais la complexité du ciblage tissulaire spécifique et du transport dans le noyau cellulaire s'avère ardu. Plusieurs types d'approches sont envisagées mais la thérapie génique à base de virus s'impose largement, surtout grâce à son efficacité (Kay et al., 2001). Plusieurs critères définissant le vecteur de thérapie génique parfait sont alors établis (Lu, 2004).

1. La faisabilité : le vecteur doit être simple à produire afin de permettre une production à grande échelle pour des applications thérapeutiques chez l'homme.
2. La régulation de l'expression du transgène doit être adaptée aux types d'applications thérapeutiques. Par exemple, le traitement de l'hémophile nécessite l'expression continue d'un facteur de coagulation sanguine, tandis que pour le diabète, l'expression de l'insuline est transitoire.
3. Le vecteur et le transgène ne doivent pas déclencher de réaction immunitaire de la part de l'organisme.
4. Le vecteur doit être spécifique du tissu endommagé et garantir une dispersion limitée.
5. Il doit posséder une capacité de transport pour tous les types de transgènes, comme par exemple l'insuline (350 pb) ou la dystrophine (11 055 pb).
6. Le vecteur doit se transmettre lors de la division des cellules.
7. Enfin il doit également être capable de toucher tous les types cellulaires, quiescents ou en division, selon l'application.

Les vecteurs créés à partir de virus doivent tendre vers un maximum de ces critères. Parmi les différentes familles de virus utilisées, les virus associés aux adénovirus ont subi un développement

important comme vecteur pour la thérapie génique.

1.4.1 Les virus associés aux adénovirus

Les virus associés aux adénovirus (AAV) font partie de la famille des *Parvoviridae* et de la sous-famille des *Parvovirinae* du genre des *Dependovirus*, (Flotte et al., 2005). Les AAV semblent être des virus commensaux des mammifères dont plusieurs sérotypes sont retrouvés chez les primates (Flotte et al., 2005). Les premiers AAV ont été identifiés comme contaminants des stocks d'adénovirus humains. Les AAV ne semblent pas avoir d'effets pathogènes chez l'homme (Wu et al., 2006). Néanmoins, ils provoquent une réponse immunitaire, comme le prouvent les 80% d'individus séropositifs pour l'AAV2 dans la population générale (Vasileva et al., 2005). Actuellement, 110 variants ont été isolés en partie grâce au séquençage du génome de l'AAV2. Les 110 variants ont été classés en 12 sérotypes, selon leur spécificité vis-à-vis de sérum d'anticorps neutralisant (Schultz et al., 2008). Le sérotype AAV2 est le plus étudié et il sert de référence pour les autres, tant au niveau des mécanismes de réplication que pour l'étude de la relation entre la spécificité tissulaire et la structure tertiaire de la capside.

La structure de l'AAV.

Le génome des AAV est constitué d'un ADN simple brin de 4,7 kb et peut-être divisé en trois parties. La première partie est constituée par les ITR pour « inverted terminal repeates » (Figure 12A). La seconde partie est constituée du gène *rep*. La troisième partie code pour les protéines cap (Lu, 2004) et une protéine AAP, pour « Assembly-activating protein », qui participe à la cinétique d'assemblage de la capside virale (Sonntag et al., 2010) (Figure 12A).

Les ITR sont présents en 5' et 3' du génome et forment une structure en forme de T et longue de 145 nucléotides (nt). La séquence ADN est riche en GC et constituée de palindromes . Les ITRs servent à la réplication du génome, à l'encapsidation et interagissent avec des protéines de l'hôte (Figure 12A) ((Lu, 2004) ; (Flotte et al., 2005)).

Le gène *rep* code pour 4 protéines transcrites à partir de différents promoteurs dont certaines possèdent une activité hélicase ou endonucléase. Les protéines REP participent à l'intégration de l'ADN viral au site spécifique AAVS1 sur le chromosome 19 du génome humain et à l''encapsidation du génome viral dans la capside (Figure 12B) (Lu, 2004).

La capside virale est obtenue par l'assemblage des protéines VP1, VP2 et VP3 et elles sont encodées

par le gène *cap*. Les protéines VP s'assemblent en icosaèdre de symétrie T=1 et de diamètre 26 nm. Les trois protéines sont obtenues par translation de différents codons initiateurs sur un même ARN messager, mais possèdent en commun la partie C-terminale (C-ter). VP1 est la protéine la plus grosse avec 90 kDa, suivie de VP2 avec 72 kDa et VP3 avec 60 kDa. La capside contient les épitopes de reconnaissance des récepteurs cellulaires nécessaires à l'entrée dans la cellule mais également les épitopes reconnus par les anticorps ((Lu, 2004) ; (Flotte et al., 2005)).

La première classification des sérotypes se base sur leur capacité à être neutralisés par des sérums spécifiques. L'identification de la séquence génomique de l'AAV2 a permis d'identifier des AAV variants dans différents tissus humains et chez les primates, principalement. Les AAV semblent être confinés aux vertébrés (Wu et al., 2006).

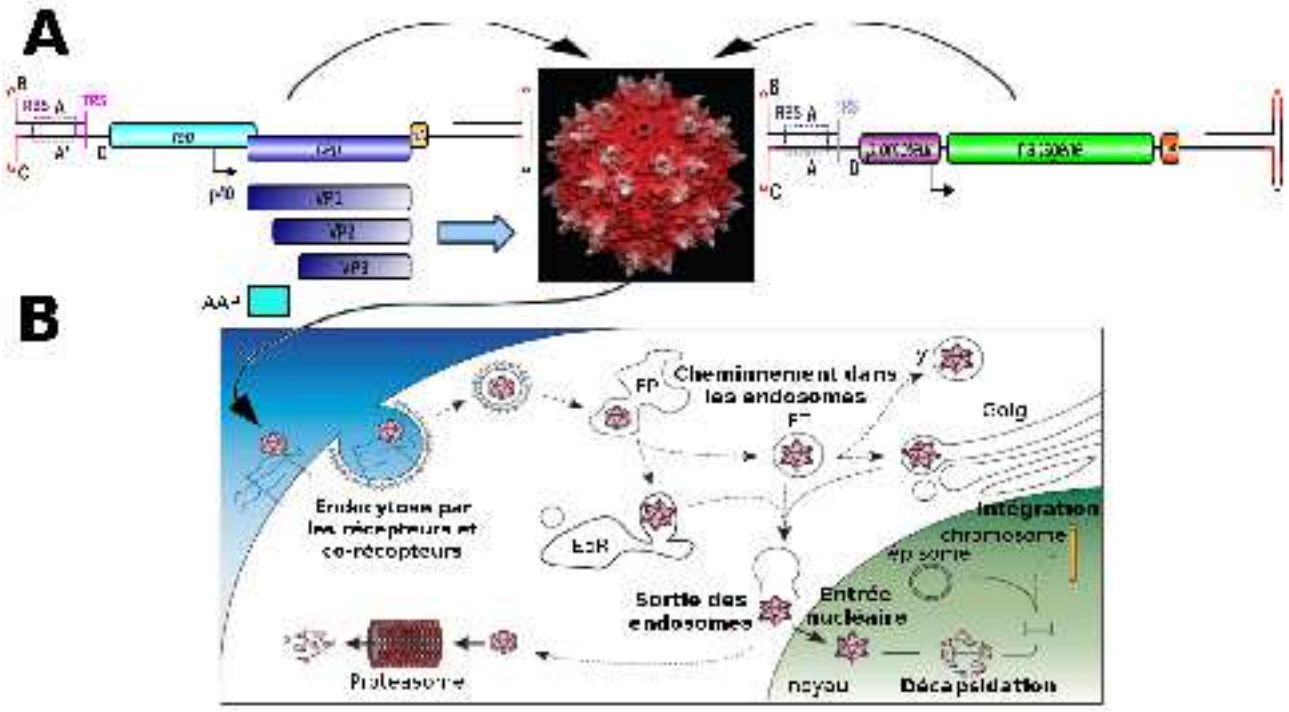


Figure 12 : Génome, structure et cheminement du virus associé aux adénovirus et les vecteurs dérivés.

A/ À *gauche* : schéma de la structure génomique des virus associés aux adénovirus (AAV). A, A', B, C et D : séquences palindromiques constituant les « Inverted terminal reapeats » (ITR). RBS : site de liaison des protéines REP. TRS : site de résolution terminale pour l'encapsidation du génome. *rep* : gène qui code pour les protéines de la réplication virale REP. c*ap* : gène codant pour les protéines de la capside virale. VP1, 2 et 3 : respectivement, protéine virale de la capside 1, 2 et 3. p40 : promoteur de transcription du gène *cap*. AAP : « Assembly-activating protein ». pA : site de poly-adénilation des ARNs viraux. *Au milieu* : représentation de la structure cristallographique de la capside de l'AAV2. Grandes flèches : représentation de l'encapsidation. *À droite* : schéma de la structure du génome d'un vecteur de thérapie génique dérivé des AAV. PA : signal de poly-adénilation. Adapté de Xie 2002, Lu 2004 et Schultz 2008 ((Lu, 2004) ; (Schultz et al., 2008)). **B/** Schéma du trajet d'un virus AAV dans la cellule hôte. EP : endosome précoce. EdR : endosome de recyclage. ET : Endosome tardif. Ly : lysosome. Adapté de Schultz 2008 (Schultz et al., 2008).

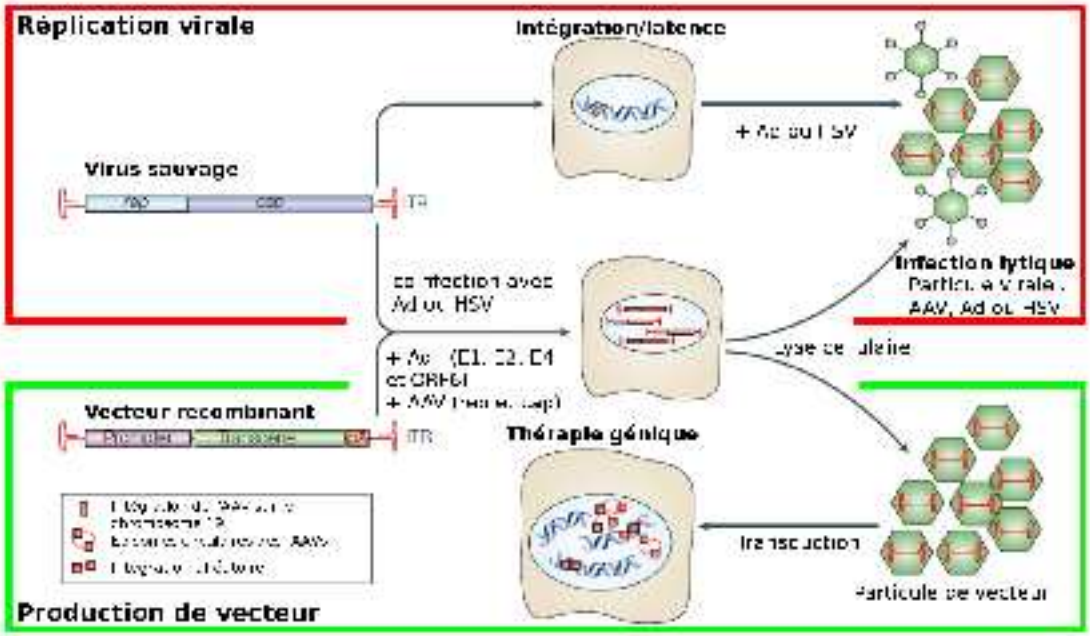


Figure 13 : schéma du processus de réplication des virus AAV et de production des vecteurs recombinants dérivés des AAV.

Partie rouge : cycle de vie des AAV. *rep* : gène codant pour les protéines de réplication REP. *cap* : gène codant pour les protéines de la capside virale. Ad : adénovirus. HSV : virus de l'herpes simplex. Partie verte : cycle de production d'un vecteur recombinant dérivé des AAV, par la méthode de coinfection avec un virus auxiliaire, ou par la co-transfection avec un plasmide contenant des protéines d'aide à la réplication du génome. E1, E2, E4 et ORF6 : gènes provenant de l'adénovirus. Adapté de Vasileva 2005 (Vasileva et al., 2005).

1.4.2 Le tropisme cellulaire du virus AAV

La spécificité tissulaire des AAV provient, pour une grande partie, de la capacité de la capside à reconnaître différents récepteurs et co-récepteurs. La fixation du virus sur son récepteur se fait très rapidement, aux alentours de 100 ms, mais l'efficacité de pénétration n'est que de 13%. L'AAV2 se lie aux protéo-glycans d'héparan sulfate (PGHS), sucres présents à la surface de certaines protéines et à l'héparine. Les AAV4 et 5 se lient aux acides sialiques, également des sucres, mais le premier reconnaît des sucres reliés entre eux par des liaisons oxygènes, tandis que le second reconnaît ceux reliés par des liaisons azote. Les AAV interagissent également avec des co-récepteurs, comme l'AAV2 avec le récepteur du facteur de croissance des fibroblastes 1 (FGF1), le récepteur du facteur de croissance des hépatocytes, les intégrines $\alpha_V\beta_5$ ou $\alpha_V\beta_1$ et le récepteur des laminines 37/67 kDa. Mais certains de ces corécepteurs jouent le rôle de récepteurs pour d'autres sérotypes, comme le récepteur des laminines 37/67 kDa avec les sérotypes 3, 8 et 9 (Figure 12B) (Schultz et al., 2008).

1.4.3 Le cycle du virus

Une fois accrochés sur leurs récepteurs et co-récepteurs, les AAV sont endocytés via les vésicules avec manteau de clathrine principalement. D'autres mécanismes d'endocytose sont également à l'œuvre de façon minoritaire. Le mode d'entrée du virus dans la cellule est conditionné suivant le type de récepteurs et de co-récepteurs qu'il reconnaît. Les partenaires impliqués dans l'endocytose ne sont pas les mêmes (Schultz et al., 2008).

Le trajet à travers différents compartiments cellulaires conditionne le fonctionnement du virus. La capside subit des changements qui permettent la progression du virus. Le trajet à travers le cytoplasme n'est pas complètement élucidé.

Par exemple, le domaine phospholipase A2 de VP1 participe à la sortie des endosomes et, toujours sur VP1, un groupe d'acides aminés (aa) basiques appelés BC, remplit la fonction de signal de localisation nucléaire. Ces deux domaines sont dans la capside lorsque celle-ci est endocytée. L'acidification des endosomes et le clivage par différentes cathepsines spécifiques du sérotype, provoquent un changement de conformation de la capside et l'externalisation des deux domaines (Figure 12B) (Schultz et al., 2008).

En faible quantité, le sérotype AAV2 voyage principalement par les endosomes tardifs. Tandis qu'en plus forte quantité, on le retrouve dans d'autres endosomes. (Figure 12B) (Schultz et al., 2008). La capside semble voyager par l'intermédiaire des microtubules et/ou des microfilaments pour arriver à la périphérie du noyau (Figure 12B) (Schultz et al., 2008).

Les AAV sont des virus qui ne peuvent pas se répliquer seuls. Ils ont besoin d'un virus auxiliaire. Ce virus auxiliaire est compétent pour sa propre réplication et le plus commun d'entre eux est l'adénovirus. D'autres virus auxiliaires existent, comme le Virus de l'Herpes Simplex (HSV) ou le cytomégalovirus (Figure 13) (Lu, 2004).

Lorsque l'AAV infecte des cellules humaines sans l'aide d'un virus auxiliaire, il s'intègre dans le génome de l'hôte au site spécifique AAVS1. Le site AAVS1 se situe sur le chromosome humain 19 et il est présent également dans le génome des primates. Il ne semble pas y avoir de site AAVS1 chez les autres mammifères. L'insertion de l'AAV se fait par interaction entre une séquence génomique de 33 paires de bases (pb), des protéines de l'hôte, les ITR et les protéines REP de l'AAV ((Smith, 2008), (Flotte et al., 2005)).

En présence du virus auxiliaire, l'AAV se réplique grâce aux protéines du virus auxiliaire et de l'hôte. Le génome simple brin se réplique sous forme linéaire ou circulaire ((Musatov et al., 2002), (Schultz et al., 2008)) en vue de produire des génomes simple brin. Les protéines de capsides sont transcrites et s'accumulent pour former de nouveaux virions (Figure 13) (Schultz et al., 2008).

1.4.4 Les vecteurs recombinants dérivés des AAV

Les AAV présentent certains avantages lorsqu'ils sont employés pour devenir des vecteurs de thérapie génique. Les virus endogènes subissent des modifications afin de devenir des vecteurs recombinants (rAAV).

Le génome du virus subit les plus importantes modifications puisque, sur le génome du vecteur recombinant, il ne subsiste que les ITR endogènes car elles sont nécessaires pour la phase d'encapsidation du génome. Le reste de la séquence génomique est remplacé par la cassette transgénique qui peut contenir plusieurs éléments. La taille maximale de la cassette est de 4,7 kilobases (kb) en général, mais elle peut monter jusqu'à environ 5,6 kb. Dans le cadre d'une application thérapeutique, la cassette contient essentiellement le gène d'intérêt thérapeutique, le plus souvent réduit à sa plus simple expression, et un promoteur qui permettra l'expression du gène (Figure 12A) (Lu, 2004). Les rAAV perdent leur capacité d'intégration dans le site AAVS1 (Schultz

et al., 2008).

Le génome modifié est ensuite encapsidé avec des protéines de capsides provenant des différents sérotypes d'AAV identifiés. La première méthode de production des rAAV consiste à mimer le cycle de réplication normal des AAV. Des cellules productrices sont transfectées avec le génome d'intérêt et un vecteur contenant les gènes *rep* et *cap*. Elles sont ensuite infectées avec un virus auxiliaire. Cependant, ce mode de production présente un problème sanitaire pour des applications thérapeutiques puisque les productions sont contaminées par du virus auxiliaire (Figure 13) (Lu, 2004). La deuxième stratégie a donc été développée pour éviter le problème de contamination. Le virus auxiliaire est remplacé par un plasmide qui comporte les protéines de virus auxiliaires nécessaires à la réplication du génome viral. Les cellules productrices sont récoltées et les virus sont le plus souvent purifiés par centrifugation sur un gradient de densité. Le titre de la production est évalué par dot blot ou PCR quantitative et il est exprimé en génomes viraux par millilitre ($vg.mL^{-1}$) (Lu, 2004).

Les virus AAV endogènes possèdent différentes spécificités tissulaires grâce à leur capside. Ses spécificités tissulaires sont conservées lorsque les protéines de capsides sont transférées lors de l'encapsidation du génome recombinant (Schultz et al., 2008). Par exemple, différents rAAV obtenus par encapsidation du même génome avec des protéines de capsides provenant de différents sérotypes possèdent des spécificités tissulaires différentielles dans des conditions expérimentales identiques (Zincarelli et al., 2008).

Si les rAAV héritent des caractéristiques tissulaires des AAV dont ils dérivent, ils conservent également l’immuno-réactivité spécifique à chaque sérotype. Dans certains cas, les rAAV, provoquent une réponse immunitaire humorale contre la capside (Schultz et al., 2008), (Riviere et al., 2006), ou une réponse immunitaire cytotoxique contre la capside (Mingozzi et al., 2009) ou contre la protéine transgénique ((Brockstedt et al., 1999), (Manno et al., 2006)). Néanmoins, certaines études tendent à démontrer que ces réponses immunitaires seraient moins importantes que celles déclenchées par des vecteurs basés sur les adénovirus (McCaffrey et al., 2008). Dans d'autres conditions, le vecteur recombinant ne semble pas induire de réponse immunitaire puisqu'il permet une expression du transgène supérieure à un an chez la souris et les primates ((Riviere et al., 2006) ; (Nathwani et al., 2011)).

1.5 De la technologie aux traitements

Les preuves de l'efficacité des AAV comme vecteurs de thérapie génique se multiplient pour des maladies courantes comme le diabète ou le cancer, mais également pour des maladies rares (fréquence d'apparition inférieure à 1/2000 naissance) et monogéniques. En 2003, un premier essai clinique a été lancé pour soigner la maladie de Parkinson (Lu, 2004) et aujourd'hui il existe entre 3 (Mueller et al., 2008) et 5 (Mingozzi et al., 2011) essais cliniques dépassant la phase I pour différentes maladies rares. Les essais de phases I sont l'aboutissement de plusieurs étapes dans le développement d'un traitement de thérapie génique pour une maladie.

Le développement du traitement de l'hémophilie du type B (OMIM 306900) par la thérapie génique illustre l'efficacité de la technique et les étapes importantes du processus. L'hémophilie du type B est causée par des mutations dans le gène du facteur de coagulation sanguine IX (F9). Le gène donne une protéine longue de 461 aa.

Le choix du transgène thérapeutique est une étape importante dans le développement du traitement. Dans le cadre de l'hémophilie de type B, l'ADN complémentaire (ADNc) du gène a une taille suffisante pour être contenu dans le génome de l'AAV. Certaines études ajoutent, au choix du transgène, des étapes d'optimisation, tout en vérifiant l'absence de toxicité de ces nouvelles protéines transgéniques ((Schuettrumpf et al., 2005) ; (Kao et al., 2010)).

Le choix d'un transgène peut s'avérer plus compliqué, comme pour le traitement de la dystrophie de Duchenne (DMD ; OMIM 310200). Le gène de la dystrophine donne un ADNc de 13,9 kb trop grand pour tenir dans le génome de l'AAV. Dans ce cas, la définition d'un transgène thérapeutique passe par diverses stratégies afin de trouver un transgène thérapeutique ((Jørgensen et al., 2009) ; (Koo et al., 2011) ; (Yoshimura et al., 2004)).

Apporter la preuve de l'efficacité du transgène thérapeutique sur la maladie est une étape importante dans le développement du traitement. Les meilleures preuves de concept sont généralement obtenues sur le modèle animal de la maladie qui permet une étude dans des conditions optimales. Le succès du concept est déterminé par différents choix stratégiques qui peuvent changer en fonction des résultats obtenus.

Les essais réalisés chez la souris dans le traitement de l'hémophilie B ont démonté la présence d'une réaction immunitaire contre la protéine transgénique ((Herzog et al., 1997) ; (Fields et al., 2000) ; (Herzog et al., 2002)). Cet obstacle a été contourné par le changement d'organe excréteur cible ((Mingozzi et al., 2002) ; (Arruda et al., 2001)), du type de promoteur ((Lai et al., 1999) ;

(Hagstrom et al., 2000) ; (Liu et al., 2004)), du sérotype (Mingozzi et al., 2002) ou encore de l'induction d'une tolérance au transgène (Mingozzi et al., 2003).

Enfin, avant de passer au développement du traitement chez l'Homme, il faut confirmer la capacité thérapeutique du vecteur sur différents modèles animaux, le plus souvent un modèle canin de la maladie.

Dans le cadre du traitement de l'hémophilie, Herzog et ses collaborateurs ont démontré l'efficacité du traitement chez le chien sur une période supérieure à un an et demi (Herzog et al., 1999).

La définition d'une stratégie thérapeutique basée sur le transfert de gène nécessite un minimum de connaissances sur la fonctionnalité de la protéine, de bonnes connaissances sur la physiopathologie de la maladie et surtout connaître le gène responsable de la maladie. La stratégie mise en œuvre est souvent adaptée aux résultats découlant des différentes étapes jalonnant la définition du produit thérapeutique.

1.5.1 La thérapie génique de la myopathie myotubulaire

La conservation de l'altération du phénotype musculaire, en absence de myotubularine, de la drosophile jusqu'à l'homme, met en évidence la conservation des rôles biologiques de la myotubularine dans le muscle. Cependant, les mécanismes biologiques sont encore mal compris, ce qui ralentit le développement de traitements pharmacologiques ciblés. L'existence du modèle murin de la pathologie humaine et le manque de connaissances sur le fonctionnement de la myotubularine ont conduit au développement d'une stratégie thérapeutique basée sur le transfert de gène.

Définition du transgène thérapeutique et preuve de concept thérapeutique.

L'identification de l'ADNc de la myotubularine murine comme transgène capable de corriger le phénotype musculaire a permis de démarrer le développement du traitement thérapeutique de la myopathie myotubulaire par la thérapie génique. Le premier vecteur contenait la séquence codante complète de la myotubularine murine sous la dépendance du promoteur ubiquitaire CMV (Buj-Bello et al., 2008). La cassette thérapeutique résultante est compatible avec la taille du génome des AAV, et elle a été encapsidée dans le sérotype 1 des AAV (Buj-Bello et al., 2008) car il possède une plus grande spécificité musculaire que l'AAV2 (Zincarelli et al., 2008).

La preuve de concept du fonctionnement de ce premier vecteur a été réalisée localement chez des souris malades âgées de 4 semaines. L'expression du transgène et son effet sur le muscle malade ont été analysés un mois après (Buj-Bello et al., 2008). Le vecteur a permis d'avoir une quantité, de myotubularine, très supérieure au niveau physiologique. La présence de la protéine transgénique dans le muscle malade a corrigé la masse musculaire, l'histologie des myofibres, ainsi que la force musculaire (Buj-Bello et al., 2008). Cependant, malgré un succès important, l'étude a montré que la trop forte quantité de protéines transgéniques dans le muscle mutant provoquait des infiltrations inflammatoires sporadiques autour des myofibres transduites. L'étude a également montré qu'une trop grande quantité de protéines thérapeutiques dans le muscle sain, provoquait des anomalies histologiques comme l'accumulation de membrane dans la fibre musculaire. Ces deux événements semblent montrés qu'une trop grande quantité de protéines thérapeutiques dans le muscle peut avoir des conséquences sur l'intégrité des myofibres. Ils montrent également que des améliorations sont à apporter au niveau du vecteur pour un meilleur contrôle de la quantité de protéines transgéniques (Buj-Bello et al., 2008).

Mon travail de thèse : le développement du traitement de thérapie génique pour la myopathie myotubulaire.

Mon travail de thèse se décompose en trois parties et entre dans le cadre du développement du traitement de la myopathie myotubulaire par la thérapie génique.

La première partie consiste à apporter la preuve de concept que notre vecteur est capable de permettre l'expression de notre protéine transgénique dans l'ensemble des muscles de l'organisme atteint de myopathie myotubulaire. La preuve de concept précédente laisse planer la possibilité que la quantité trop importante de myotubularine pourrait entraîner l'apparition d'une réponse immunitaire et d'accumulation de membrane. Afin de mieux contrôler la quantité de protéines transgéniques dans le muscle nous avons remplacé le promoteur ubiquitaire CMV par un promoteur desmine plus spécifique du muscle. L'efficacité de la nouvelle cassette thérapeutique est établie localement sur les deux modèles murins de myopathie myotubulaire. La présence de la protéine transgénique dans le muscle est évaluée par western blot et l'efficacité de la protéine transgénique sur le phénotype musculaire de la myopathie myotubulaire est évaluée au niveau de la morphologie (histologie et poids du muscle) et de la fonctionnalité du muscle malade.

Une fois la nouvelle cassette validée, sa capacité thérapeutique est évaluée sur l'ensemble des muscles de l'organisme malade. La cassette desmine-MTM1 est encapsidée dans le sérotype 9 des

AAV car c'est le sérotype le plus efficace pour transduire les muscles après une injection intraveineuse (Zincarelli et al., 2008). Le vecteur AAV9-Desmine-MTM1 est injecté par voie intraveineuse chez les deux modèles murins de myopathie myotubulaire pour obtenir des résultats plus robustes. La présence de la protéine transgénique et son efficacité sur le muscle sont évaluées grâce à une cinétique en deux points. La spécificité musculaire du vecteur est apportée par l'étude de la quantité de protéines transgéniques dans différents organes vitaux.

La seconde partie de mon travail de thèse consiste étudier la capacité thérapeutique du transgène MTMR2, homologue d'MTM1, sur le phénotype de la myopathie myotubulaire. La potentielle réaction immunitaire contre la protéine transgénique MTM1 observée dans le modèle mutant complet, lors du premier essai de thérapie génique pour la myopathie myotubulaire (Buj-Bello et al., 2008), a conduit l'équipe à rechercher des transgènes alternatifs. La sélection s'est opérée selon plusieurs critères qui sont :

La protéine issue du transgène doit être présente dans l'organisme.

La protéine doit pouvoir remplacer l'action thérapeutique de la myotubularine.

Le choix s'est arrêté sur MTMR2, car l'identité de séquence avec MTM1 est la plus forte dans la famille des MTMRs. Bien que la protéine MTMR2 soit en très faible quantité dans le muscle, une étude chez le modèle poisson de la myopathie myotubulaire a démontré que son augmentation artificielle dans le muscle malade corrigeait le phénotype musculaire (Dowling et al., 2009). La preuve de l'efficacité thérapeutique du transgène MTMR2 a été étudié localement chez le modèle murin de la myopathie myotubulaire.

La troisième partie de ma thèse est consacrée à apporter la preuve que l'activité phosphatase de la myotubularine est bien nécessaire pour remplir son rôle thérapeutique. Afin de montrer le rôle fondamental de l'activité phosphatase dans la pathologie et la nécessité de cette activité pour la guérison de la maladie, nous avons utilisé une forme de myotubularine catalytiquement inactive. La myotubularine mutante est obtenue en substituant la cystéine 375 du site catalytique en sérine pour la rendre catalytiquement inactive (MTM1cs). Les effets du transgène MTM1cs sur le phénotype musculaire vont être comparés aux effets du transgène thérapeutique MTM1 utilisé précédemment.

2 Matériels et méthodes

2.1 Souches et modèles murins

2.1.1 Élevage des animaux

Les souris sont manipulées dans le respect des règles éditées par la législation française en accord avec les directives européennes sur l'expérimentation animale. Les souris sont élevées en animalerie dans un confinement de type A2. Elles sont nourries avec de la nourriture standard pour les contrôles et de la nourriture hydratée pour les mutants.

2.1.2 Les modèles mutants complets et muscles spécifiques

Le modèle mutant MTM1 muscle spécifique (mKO), de fond C57BL/6, est obtenu par croisement des femelles homozygotes pour l'allèle BS53.52 (contenant 2 sites LoxP autour de l'exon 4 du gène *Mtm1*) avec des mâles transgéniques exprimant la recombinase Cre de façon muscle spécifique, grâce, au promoteur du gène de l'α-actine humaine. La recombinase étant présente sur un seul chromosome, les mâles qui n'ont pas reçu la recombinase sont utilisés comme souris contrôles (Buj-Bello et al., 2002).

Les mâles mutants constitutifs pour le gène *Mtm1* (KO), de fond 129-PAS-ICO, sont obtenus à partir de femelles hétérozygotes pour l'allèle qui contient une délétion de l'exon 4 avec des mâles sauvages du même fond génétique ((Buj-Bello et al., 2002) ; (Al-Qusairi et al, 2009)).

2.2 Expérimentation animale

(Réalisé par le service d'évaluation fonctionnelle de Généthon)

2.2.1 Anesthésie

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale avec 100 µl d'un mélange de Kétamine et de Xylazine (ROMPUM) pour un poids de souris de 20 g. L'anesthésie est utilisée avant l'injection transcutanée du tibialis antérieur (TA) et pour la chirurgie précédant l'injection de l'extenseur digitorum longus (EDL).

Dose anesthésique :

Kétamine :	100 $mg.kg^{-1}$
Xylazine :	10 $mg.kg^{-1}$

2.2.2 Injection intramusculaire

L'injection du tibialis antérieur est réalisée en transcutanée car le muscle est accessible par l'avant de la loge antérieure au niveau des pattes postérieures. Un volume constant de 20µL est injecté à l'aide d'une seringue Hamilton.

L'injection de l'extenseur digitorum longus (EDL) est réalisée après séparation du muscle de la loge antérieure. Une incision est réalisée au bas de la patte arrière à l'aide d'un scalpel. Le muscle est identifié par son tendon et isolé du reste de la loge à l'aide d'une spatule métallique fine. La spatule sert également de support lors de l'injection. Un volume de 7 µL est injecté à l'aide d'une seringue de chromatographie, car le diamètre de l'aiguille est beaucoup plus fin que celui de la seringue Hamilton.

2.2.3 Injection intraveineuse

L'injection intraveineuse est réalisée dans la veine de la queue sans anesthésie préalable. La souris est contentionnée dans un tube afin de réduire au maximum ses mouvements. Un volume maximum de 600µl est injecté à l'aide d'une seringue à insuline (Terumo, 29G 1/2) de 0,5 mL.

2.3 Plasmides et production des vecteurs

(Réalisé par le service de production des vecteurs de Généthon)

2.3.1 Plasmides

Le plasmide pGG2 (Généthon) comporte les ITRs du sérotype 2 des AAV qui entourent la cassette d'intérêt contenant le promoteur ubiquitaire CMV et le gène d'intérêt. La cassette CMV-MTM1C375S contient l'ADN complémentaire (ADNc) de la myotubularine murine avec une mutation de la cystéine 375 en sérine (T1123A). La cassette CMV-MTM1 contient l'ADNc de la myotubularine murine.

Les plasmides pAAV-DES-MTM1 et pAAV-DES-MTMR2 (Généthon) contiennent les ITRs du sérotype 2 des AAV et le promoteur synthétique desmine (DES). Le promoteur synthétique est constitué de deux parties qui proviennent du promoteur de la desmine humaine. La première partie est constituée d'un fragment compris entre le site de transcription du gène humain et la position -228. La seconde partie est constituée d'un fragment situé entre la position -693 et -973. La deuxième partie est en amont de la première dans le promoteur synthétique (Li et al., 1991). Les cassettes thérapeutiques contiennent soit l'ADNc de la myotubularine murine (DES-MTM1) soit l'ADNc de MTMR2 murin (DES-MTMR2).

Les plasmides pAAV1 et pAAV9 (Généthon) contiennent les gènes *REP* et *CAP* (cap selon les sérotypes 1 et 9).

Le plasmide pXX6 contient les gènes (VA RNA, E2A et E4 ; DBP = protéines de liaisons à l'ADN simple brin) de l'adénovirus Ad5 nécessaires à la réplication du génome de l'AAV et l'expression des protéines virales.

2.3.2 Production des vecteurs recombinants

Transfection.

La méthode de production des différents vecteurs utilise la technique de tri-transfection qui permet une production dépourvue de virus « helper ». Des cellules HEK293 adhérentes cultivées dans des CF10 (Thermo Scientific NUNC) sont transfectées avec les trois plasmides, pGG2 contenant la cassette d'intérêt, pXX6 et le plasmide contenant les protéines de la capside, à un ratio de 2:1:1 à l'aide de phosphate de calcium (Généthon, (Xiao et al., 1998), (Zhang et al., 2001), (Xiao et al., 1996)).

Récolte.

Les cellules sont récoltées par chélation ionique à l'EDTA 60 heures après la transfection. Le surnageant est centrifugé à 40 000 g et le culot de cellules est lysé par trois cycles de congélation-décongélation. Le surnageant est purifié sur deux gradients de chlorure de césium successifs (Généthon, (Xiao et al., 1998), (Zhang et al., 2001), (Xiao et al., 1996)).

Titre de la production

Le titre des différentes fractions récoltées est évalué rapidement par dot blot grâce à une

gamme étalon. Les sondes sont dirigées contre les ITRs de l'AAV2. Les fractions les plus concentrées sont alors regroupées ensemble, puis dialysées contre du PBS stérile (GIBCO).

Le titre de la production est évalué par PCR quantitative grâce à la technologie TaqMan (Applied Biosystem). Les suspensions virales sont traitées à la DNAse I avant d'être digérées à la protéinase K (Généthon, (Rohr et al., 2002)). L'ADN génomique est extrait à l'aide du kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche) selon le protocole du fabriquant. Les ITRs de l'AAV2 sont amplifiées à l'aide des amorces spécifiques sur thermocycleur en temps réel ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystem). Le titre de la production est donné en génome viral par millilitre (vg/mL) (Généthon, (Bièche et al., 1998), (Fougerousse et al., 2007)).

Amorce :

Sens : 5'-CTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTA-3'.

Anti-sens: 5'-TGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGC-3'.

Sonde TaqMan : 5'-GTTAATGATTAACCC-3'.

Les vecteurs qui ont ainsi été produits sont: AAV1-CMV-MTM1C375S, AAV1-CMV-MTM1, AAV1-DES-MTM1, AAV8-DES-MTM1, AAV9-DES-MTM1, AAV1-DES-MTMR2, AAV9-DES-MTMR2.

2.4 Doses de vecteurs

2.4.1 Injection intramusculaire : le modèle mKO

Les vecteurs sont injectés dans le muscle tibialis antérieur ou EDL des mâles 4 semaines après la naissance. Les muscles contralatéraux sont injectés avec du PBS comme contrôle. Quatre semaines après l'injection, les souris sont anesthésiées et les muscles sont prélevés pré-mortem. Après le prélèvement, les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale.

Vecteurs	Dose TA (20 µl)	Dose EDL (7 µl)
AAV1-CMV-MTM1C375S	$1{,}8 \times 10^{12}$ vg ($8{,}6 \times 10^{14}$ vg.kg^{-1})	-
AAV1-CMV-MTM1	$1{,}8 \times 10^{12}$ vg ($8{,}6 \times 10^{14}$ vg.kg^{-1})	-
AAV1-DES-MTM1	$3{,}5 \times 10^{9}$ vg ($1{,}7 \times 10^{14}$ vg.kg^{-1})	$1{,}75 \times 10^{9}$ vg

2.4.2 Injection intramusculaire : le modèle KO

Les vecteurs sont injectés dans le muscle tibialis antérieur (20 µl) ou EDL (7 µl) des mâles 3 semaines après la naissance. Les muscles contralatéraux sont injectés avec du PBS comme contrôle. Deux semaines après l'injection, les souris sont anesthésiées et les muscles sont prélevés pré-mortem. Après le prélèvement, les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale.

Vecteurs	Dose TA (20 µl)	Dose EDL (7 µl)
AAV1-CMV-MTM1C375S	$1,8x10^{12}$ vg ($9,2x10^{14}$ vg.kg^{-1})	-
AAV1-CMV-MTM1	$1,8x10^{12}$ vg	-
AAV1-DES-MTM1	$3,5x10^{9}$ vg ($1,7x10^{14}$ vg.kg-1)	$1,75x10^{9}$ vg
AAV1-DES-MTMR2	$3,6x10^{9}$ vg ($1,7x10^{14}$ vg.kg^{-1})	$1,3x10^{9}$ vg
AAV9-DES-MTMR2	$2,7x10^{10}$ vg ($1,9x10^{15}$ vg.kg^{-1})	$9,3x10^{9}$ vg

2.4.3 Injection intraveineuse

Les vecteurs sont injectés dans la veine de la queue des mâles Mtm1 KO à l'âge de 3 semaines, selon les doses et volumes indiqués ci-dessous (le volume final est ajusté avec du PBS). Un volume équivalent de PBS est injecté dans les souris contrôles.

Vecteur	Dose et volume
AAV9-DES-MTM1	$4,1x10^{13}$ vg.kg-^{1} dans un volume de 748 µL/20 g

De la même façon, les mâles mKO et contrôles respectifs sont traités à l'âge de 4 semaines selon la dose indiquée ci-dessous.

Vecteur	Dose et volume
AAV9-DES-MTM1	$5,2x10^{12}$ vg.kg-^{1} dans un volume de 615 µL/20 g

2.5 Préparations histologiques

(Réalisé par le service d'évaluation fonctionnelle de Généthon)

2.5.1 Les muscles

La peau est coupée à l'aide de ciseaux de Dowell droit (Moria), puis les muscles squelettiques sont disséqués de leur logement à l'aide de deux pinces à iris droites (Moria) et séparés de leurs tendons par des ciseaux délicats (Biotek). Le muscle est enfoncé dans la gomme (Gomme TRAGACANTH, Sigma ; 6g pour 100ml d'eau distillée) par son plus petit tendon, jusqu'au support en liège (VWR) et le tout est plongé dans l'isopentane (Sigma) refroidi par de l'azote liquide (Aire liquide) à son point de congélation. Le muscle est immergé dans l'isopentane durant 1 minute pour les muscles de poids inférieur à 50 mg et 2 minutes pour les muscles plus gros. Le cœur est aussi monté sur support de liège et congelé dans de l'isopentane refroidi à l'azote. Les muscles sont conservés conservés à -80°C.

Les muscles congelés sont coupés à l'aide d'un cryostat (Leica). Pour l'analyse histologique, plusieurs lames sériées contenant des coupes d'une épaisseur de 7µm sont obtenues et conservées à -80°C jusqu'à l'utilisation. De plus, plusieurs coupes de 30 µm sont prélevées pour des extractions protéiques, d'ARN et d'ADN, lesquelles sont conservés à -80°C.

2.5.2 Les organes

Les organes sont disséqués à l'aide des ciseaux de Dowell droits et les pinces fines à iris, puis séparés des tissus conjonctifs à l'aide des ciseaux délicats. L'un des deux organes binaires est mis dans un tube Eppendroff 1,5 ml et plongé directement dans l'azote. Le cerveau, la rate et le foie sont coupés en deux. L'une des deux parties est mise dans un tube Eppendorff 1,5 ml puis plongée dans l'azote. Les organes congelés sont utilisés pour l'extraction de protéines. Les organes non congelés restants sont insérés dans une cassette histologique, puis ils sont fixés 24 heures dans une solution de glutaraldéhyde à 10 %. Les organes sont ensuite traités à l'aide d'un automate qui les déshydrate avec des bains d'alcool de concentration croissante et un bain de xylène (Leica ST5020). Finalement, les organes sont inclus dans des blocs de paraffine et coupés en sections de 8 µm d'épaisseur. Les coupes sont ensuite déposées sur lame de verre pour permettre la coloration et

l'analyse histologique.

2.6 Colorations histologiques

2.6.1 Hématoxyline-éosine

(Réalisé par le servie d'histologie de Généthon ou de l'IGBMC)

Les coupes de tissus provenant d'organes inclus en paraffine sont traitées avec deux bains de xylène de 3 min pour enlever la paraffine. Les coupes sont réhydratées à l'éthanol 95% 2 à 3 min, puis rincée à l'eau courante et à l'eau distillée. Les coupes provenant de tissus congelés, ou cryocoupes, sont décongelées et fixées dans une solution de paraformaldéhyde 10% dans du PBS pendant 10 min à température ambiante.

Les deux types de coupes histologiques sont ensuite colorées à l'hématoxyline de Harris (Hématoxyline à 7 g/L, Iodate de sodium à 0,2 g/L, Sulfate double d'aluminium et d'ammonium, 12 H2O à 50 g/L) pendant 4 min, puis elles sont rincées à l'eau courante. L'hématoxyline est différenciée par un passage dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique-alcool (1 ml de solution d'acide chlorhydrique saturée dans 100 ml d'éthanol à 70%). Cette étape est omise lors de la coloration hématoxyline-éosine non différenciée. Les coupes sont rincées à l'eau courante, puis elles sont passées dans l'eau de Scott (3,5g de bicarbonate de sodium, 20g sulfate de magnésium dans 1l d'eau distillée) 1 à 3 min. Une fois rincées à l'eau courante, les coupes sont colorées avec une solution d'éosine à 1% pendant 1 min. Les coupes sont rincées, déshydratées au butanol par 2 bains de 3 min chacun, puis traitées avec 2 bains d'Histosol (Life Science Products) de 3 min chacun. Les lames sont montées à l'Eukitt (LABONORD).

2.6.2 Hématoxyline-éosine-safran

(Réalisé par le service d'histologie de Généthon)

Une fois les coupes histologiques préparées comme décrit précédemment, elles sont colorées à l'hématoxyline de Harris pendant 4 min, puis différenciée par une solution aqueuse acide chlorhydrique-alcool et rincées à l'eau courante. Les coupes sont ensuite traitées avec une solution d'eau de Scott pendant 1 à 3 min, puis rincées à l'eau courante. Elles subissent une étape de

coloration avec une solution 0.2% de phloxine dans de l'eau distillée pendant 30 secondes. Après un rinçage à l'eau courante, la phloxine est décolorée avec une solution d'éthanol à 70% pendant une minute. Les coupes sont rincées à l'éthanol absolu, puis colorées avec la solution de safran (20 g de poudre de safran (LABONORD), dans 1L d'éthanol absolu) pendant 3 min. Après un rinçage à l'éthanol absolu, les coupes sont traitées avec deux bains d'Histosol de 3 min chacun, puis les lames sont montées à l'Eukitt.

2.6.3 NADH-TR

Les cryocoupes de muscles sont incubées dans une solution de coloration au bleu tétrazolium (Tris 50 mM à pH = 7,3, 1,2 mM de Nitro Blue BT et 0,6 mM de DPNH, Sigma), préparée extemporanément, à 57°C pendant 10 min. La réaction de coloration est arrêtée par un lavage à l'eau distillée. Les coupes sont ensuite déshydratées avec des bains successifs d'éthanol 70%, 95% et 100% pendant 2 min chacun, puis un second bain d'éthanol 100% pendant 2 min et deux passages dans deux bains d'Histosol. Les lames sont montées avec de l’Eukitt.

2.6.4 Rouge Sirius

(Réalisé par le service d'histologie de Généthon)

Les coupes de tissus congelés sont traitées avec un premier bain de formol à 10% dans du PBS pendant 10 min, puis une solution de picro-formaline pendant 10 min. Elles sont ensuite rincées à l'éthanol 90% pendant 1 min, puis rincées à l'eau distillée pendant 1 min. Les coupes sont colorées avec une solution de rouge Sirius (1 g de rouge Sirius dans 1L d'eau distillée saturée en acide picrique) pendant 60 min à température ambiante. Ensuite, les coupes histologiques sont rincées à l'eau distillée et déshydratées dans un bain d'éthanol à 95°C, suivit de deux bains d'éthanol 100%. Après passage dans deux bains d'Histosol, les coupes sont montées à l'Eukitt.

2.7 Immunodétections

Toutes les procédures décrites ci-après concernent des coupes histologiques provenant de tissus congelées.

2.7.1 Laminine

(Réalisé par le service d'histologie de Généthon)

Les coupes sont décongelées pendant 10 min à température ambiante, puis entourées au Dakopen (DAKO) et séchées pendant 5 min. Les péroxydases endogènes sont inhibées avec une solution d'azoture de sodium (DAKO) pendant 30 min à température ambiante. Les tissus sont rincés au PBS pendant 5 min et incubés avec une solution de PBS avec 10% de sérum de chèvre (DAKO) pour le marquage laminine et avec une solution de PBS à 10% de sérum de Lapin (DAKO) pendant 30 min. La solution de blocage est enlevée et l'anticorps primaire dirigé contre la laminine (DAKO, Z0097), dilué au 1:1000 dans du PBS, est incubé pendant 12 heures à 4°C. Les coupes sont ensuite rincées avec trois bains successifs de PBS de 5 min chacun sous agitation et incubées avec l'anticorps secondaire couplé à une péroxydase (Kit Envision HRP Rabbit) pendant 30 min. Les coupes sont rincées comme précédemment, puis incubé avec une solution de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) diluée pendant 2 à 5 min. La solution de coloration est enlevée par un lavage à l'eau du robinet pendant 5 min à renouvellement constant. Les coupes sont déshydratées avec trois bains successifs d'éthanol 70%, d'éthanol 95% et d'éthanol 100% pendant 5 min chacun, puis deux bains de xylène. Les lames sont montées avec de l'Eukitt.

2.7.2 Myotubularine, RYR1, Desmine

Après la décongélation, chaque coupe de muscle sur une lame est entourée avec du Dakopen pour former des puits étanches, puis le tissu est fixé avec une solution de PBS contenant 4% de para-formaldéhyde pendant 7 min, suivi de trois bains de PBS successifs de 3 min chacun. Les sections de muscles sont incubées avec une solution de blocage qui contient 5% de sérum de chèvre dans du PBS pendant 45 min à température ambiante ou avec une solution de « Mouse On Mouse » (M.O.M., DAKO) diluée au 1:32ème dans du PBS pendant 20 min.

Pour détecter la myotubularine, un anticorps primaire de lapin dirigé contre la myotubularine murine (7, 8) est utilisé au 1:200ème ou 1:400ème dans une solution du PBS-0,1% Brij35-0,1% BSA, durant 60 min à 37°C ou 12 heures à 4°C. Après rinçage, l'anticorps primaire est détecté par un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre les anticorps de lapin et couplé à un fluorophore Alexa 488 (Molecular Probes) au 1:500ème dans du PBS-0,1% BSA-0,1% DAPI pendant 45 min. Le marquage du DAPI permet de visualiser les noyaux des cellules.

La détection du récepteur à la ryanodine, RYR1, dans le muscle squelettique se fait grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal de souris (abcam, ab2868) dilué au 1:250ème dans une solution de PBS-0,1% BSA et incubé pendant 60 min à 37°C ou 12 heures à 4°C. Après rinçage, l'anticorps primaire est détecté par un anticorps secondaire biotinylé de chèvre dirigé contre les anticorps de souris (Novex) et dilué 1:200 dans du PBS-0,3% BSA-0,1% DAPI pendant 45 min. Les coupes sont ensuite incubées avec de la streptavidine-Alexa 488 (Molecular Probes) diluée au 1:1000ème dans du PBS-0,1% DAPI pendant 20 min, suivi de plusieurs rinçages au PBS.

La desmine est détectée grâce à l'utilisation d'un anticorps primaire de chèvre (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, sc-7559) dilué au 1:300ème dans une solution de PBS-0,1% BSA et incubé pendant 60 min à 37°C ou 12 heures à 4°C. Le marquage de la cavéoline 3 se fait par un anticorps primaire de chèvre (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, sc-7665) dilué au 1:100ème dans une solution de PBS-0,1% Triton X100-0,01% BSA et incubé pendant 60 min à 37°C ou 12 heures à 4°C. Dans les deux cas, après rinçage, les coupes sont incubées pendant 45 min avec un anticorps secondaire biotinylé d'âne dirigé contre les anticorps de chèvre (Novex) et dilué au 1:200ème dans du PBS-0,3% BSA-0,1% DAPI, suivi d'une incubation de 20 min avec de la streptavidine-Alexa 488 (Molecular Probes) diluée au 1:1000ème dans du PBS-0,1% DAPI, puis rinçage.

Pour détecter la dystrophine, les coupes de muscles sont incubées avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la dystrophine (Novocastra, NCLDYS2) dilué au 1:20ème dans une solution de PBS-0,01% Triton X100-0,1% BSA pendant 60 min à 37°C ou 12 heures à 4°C. Après rinçage, l'anticorps primaire est détecté par un anticorps secondaire de chèvre couplé à un fluorophore Alexa 594 (Molecular Probes) dilué 1:500ème dans du PBS-0,1% BSA-0,1% DAPI pendant 45 min, suivi de plusieurs lavages au PBS.

Dans tous les cas précédents, les lames sont ensuite montées avec du Fluorsave (Calbiochem) ou du Fluoromount G (SouthernBiotech) et des lamelles. Les images des coupes de muscle marquées avec ces différents anticorps sont prises avec un microscope confocal Leica TCS-SP2.

2.7.3 Dysferline, DHPR1α et sarcaluménine

Les coupes de muscle sont mises à décongeler et sécher sur la paillasse pour ensuite être plongées pendant 10 min dans du PBS bouillant, puis 2 min dans du PBS à température ambiante. Les coupes sur les lames sont ensuite entourées individuellement à l'aide de Dakopen.

La détection de la dysferline est réalisée après saturation avec une solution de PBS-3% de BSA

pendant 45 min, puis incubation avec un anticorps monoclonal de souris anti-dysferline (NCL-Hamlet) dilué au 1:20ème dans du PBS-0,3% BSA pendant 12 h à 4°C.

Pour le marquage du récepteur à la dihydropyridine, DHPR1α, les coupes sont d'abord incubées avec une solution de PBS-0,2% Tween 20 contenant 10% de sérum de chèvre pendant 45 min. Les coupes sont ensuite incubées avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le DHPR1α (Pierce, MA3-920) dilué au 1:600ème dans du PBS-1% BSA-0,2% Tween 20 pendant 12 h à 4°C ou à température ambiante pendant 60 min.

La détection de la sarcaluménine sur les coupes de muscle est réalisée après saturation avec une solution de PBS-3% de BSA pendant 45 min, puis incubation avec un anticorps primaire de souris (Santa Cruz biotechnology, sc-58845) dilué au 1:200ème dans du PBS-0,3% BSA pendant 12 h à 4°C.

Après rinçage par trois bains de PBS successifs de 5 min chacun sous agitation constante, les différents anticorps primaires sont détectés avec un anticorps secondaire biotinylé (Novex) dilué au 1:200ème dans du PBS-0,3% BSA-0,1% DAPI et incubé pendant 45 min a température ambiante. Les tissus sont ensuite incubés avec de la streptavidine-Alexa 488 (Molecular Probes) diluée au 1:1000ème dans du PBS-0,1% DAPI pendant 20 min. Après lavage, les lamelles sont montées avec du Fluoromont G ou du Fluorsave.

Les images des différents marquages sont obtenues à l'aide d'un microsocpe confocal Leica TCS-SP2.

2.8 Quantifications histologiques

2.8.1 Aire

L'aire des fibres est déterminée manuellement grâce au logiciel Methamorph Off Line (Molecular Devices) à partir d'images de coupes transversales de muscle colorées à l'hématoxyline-éosine.

La coupe transversale de muscle colorée à l'hématoxyline-éosine est cartographiée à l'aide d'un microscope photonique classique couplé à une caméra. Les images doivent être jointives pour permettre un assemblage correct à l'aide du logiciel photoshope CS4 (Adobe). Une fois la cartographie reconstituée, l'aire des fibres est détourée manuellement dans le logiciel Methamorph (Molecular Devices). La conversion entre les pixels et les µm² se fait à l'aide d'une échelle

micrométrique prise en photo au même grossissement que les images de la cartographie.

Les critères de sélection des aires correctes sont :

1. La fibre doit être coupée entièrement de façon transversale.
2. Les zones où le muscle est mal congelé, les aires ne sont pas mesurées à cause de la déformation cryogénique.
3. Les fibres musculaires qui ne sont pas coupées entièrement en transversale ne sont pas prise en compte.

Les aires collectées et converties en micromètre carré sont moyennées pour un seul muscle. La valeur moyenne (+/- l'écart type) de la moyenne des aires de chaque muscle ayant subit un traitement identique est déterminée. Les moyennes des différents traitements sont comparées entre elles.

2.8.2 Diamètre

Le diamètre des fibres musculaires pris en compte est le plus petit diamètre de la fibre. L'avantage de cette mesure par rapport à l'aire des fibres, est qu'il prend en compte les fibres musculaires coupées légèrement ou complètement en longueur sans fausser la mesure.

Le diamètre des fibres est obtenu à partir de coupes de muscle marquées à la laminine-DAB. Les coupes de muscle sont cartographiées à l'aide d'un microscope photonique classique équipé d'une plateforme motorisée. Le logiciel Ellix (Microvision), permet de cartographier le muscle automatiquement en contrôlant la platine motorisée après délimitation du champ d'investigation manuellement. Durant la cartographie, le logiciel détecte les fibres musculaires, et approxime leur surface par une ellipse, grâce au contraste fourni par le marquage de la laminine. La conversion en micromètre est directement faite par le logiciel.

Les cartographies obtenues sont vérifiées manuellement avant analyse des données selon les critères suivants :

1. Les zones où le muscle est mal congelé, les fibres ne sont pas prises en compte du fait de la déformation cryogénique incorrecte.
2. Un filtre de taille minimale de diamètre est placé à la valeur de 7 µm. En dessous de cette valeur, il y a plus de chance de prendre en compte des ellipses artéfactuelles que des fibres musculaires dans le muscle mutant contrôle. Pour le muscle contrôle, le diamètre des fibres ne descend pas en dessous.

3. Les ellipses aberrantes sont éliminées à la main.

Le plus petit diamètre de l'ellipse est pris en compte et la moyenne des diamètres d'un même muscle est un échantillon de mesure pour un traitement.

2.8.3 Profil

L'homogénéité de la répartition des myofibres est vérifiée en établissant le profil de répartition des fibres musculaires selon leur taille. Le profil est constitué avec les aires ou les diamètres de fibres obtenus précédemment et regroupés en fonction du traitement musculaire.

Les myofibres provenant de différents muscles au sein d'un même groupe sont triées en fonction de leur taille croissante pour déterminer la taille maximale. Celle-ci est divisée par 30. Les 30 classes permettent de définir une courbe qui est un compromis entre une courbe peu et trop saccadée. Le nombre de fibre dans chaque classe, borne inférieure exclue et borne supérieure incluse, est exprimé en pourcentage de l'effectif totale.

La représentation du profil est réalisée avec les classes en abscisse et les effectifs en ordonnée.

2.8.4 Noyau

Les noyaux sont dénombrés sur des coupes transversales de muscle colorées à l'hématoxyline-éosine avec le logiciel Histolab (Microvision). Les coupes de muscle sont cartographiées à l'aide d'un microscope photonique classique équipé d'une plateforme motorisée. Le logiciel cartographie automatiquement le champ d'investigation délimité à la main.

La cartographie est ensuite analysée manuellement et le nombre de noyaux internalisés et périphériques sont dénombrés. Le taux de noyaux internalisés (TI) et celui des noyaux périphériques (TP) sont déterminés par les formules suivantes :

$$TI = \frac{i}{(i+p)} * 100 \qquad TP = \frac{p}{(i+p)} * 100$$

i= nombre de noyaux internalisés ; p = nombre de noyaux périphériques

2.9 Extraction des protéines

2.9.1 Origine : coupes histologiques

Vingt cinq à 35 coupes de tissus de 30 µm sont recueillies dans des tubes Eppendorffs préalablement tarés et refroidis dans la glace carbonique. Les protéines sont extraites des coupes avec un volume de tampon d'extraction (composition ci-dessous) déterminé selon la formule empirique de 100 µl de tampon pour 40 mg de tissu, avec un minimum de 25 µl. Le mélange est incubé sur la glace pendant 15 à 30 min après décongélation, et il est mélangé au Vortex® pendant 15 secondes toute les 5 min. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C et le surnageant est transféré dans un nouveau tube Eppendorff froid.

2.9.2 Origine : organe entier

Les organes sont broyés en fine poudre dans un mortier refroidi à l'azote liquide sur de la glace carbonique. La poudre est transférée dans un tube Eppendorff préalablement refroidit et taré. Le volume de tampon d'extraction est ajusté, après pesée, selon la formule empirique de 100 µl de tampon pour 40 mg de tissu, avec un volume minimum de 25 µL. Le mélange est incubé 15 à 30 min dans la glace avec, toutes les 5 min, un mélange au Vortex® de 15 secondes. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C et la concentration de protéines du surnageant résultant est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

La concentration protéique est déterminée grâce à une gamme étalon de BSA sur une zone de détection linéaire entre 0,125 à 1 mg/ml. La quantification est réalisée en plaque 96 puits de 300 µl perméable au UV et chaque échantillon est dupliqué. Les échantillons protéiques sont dilués, dans un premier temps au 1:25ème dans de l'eau distillée, tout comme le tampon de broyage, qui servira de témoin négatif, et les différents points de gamme de BSA. Dix microlitres de la dilution sont répartis par puits sur la plaque en double. Le réactif de Bradford (BioRad) concentré est dilué au 1:5ème dans de l'eau distillé et 200 µl sont distribués dans chaque puits. L'analyse par spectrophotométrie est réalisée par l'appareil KC4 (BioTek) à une longueur d'onde de 595 nm.

La courbe étalon de BSA pour déterminer la concentration protéique passe par zéro. Elle est obtenue en traçant la courbe de la concentration des échantillons connus en fonction de la densité optique. La détermination de la quantité de protéines se fait par report de la densité optique sur la

courbe de BSA. La concentration protéique obtenue est ensuite multipliée par le facteur de dilution (1:25ème) pour avoir la concentration dans l'échantillon de départ.

Les échantillons sont dilués à la quantité de protéines totale voulue dans les ¾ d'un volume. Le volume est complété avec ¼ de bleu de charge concentré 4 fois, qui sert également d'agent dénaturant. Les échantillons sont mélangés au Vortex® et incubé 5 min à 95°C pour obtenir des protéines linéaires et chargées en SDS.

Tampon d'extraction :

La solution de Tris-HCL (Sigma) 10 mM à pH = 7,4 contient 150 mM de NaCl (Sigma), 5 mM EGTA (Sigma), 2 mM de sodium orthovanadate simple (Sigma), 100 mM de NaF (Sigma), 4 mM de sodium pyrophosphate (Sigma), 1% (Volume à volume ou V:V) de Triton X-100 (Sigma), 0,5% (V:V) d'IGEPAL (Sigma) et une tablette du cocktail inhibiteur de protéase (Roche) pour 100 ml.

Bleu de charge dénaturant 1x :

La solution de Tris (Sigma) 250 mM à pH = 6,8. Contient 4 % (V:V) de SDS (Sigma), 25% (V:V) de Glycerol (Sigma), 250 mM de Dithiotréitol (DDT) (Sigma) et une pincée de bleu de bromophénol (Sigma).

2.9.3 SDS-PAGE

Une fois dénaturés, les échantillons sont déposés dans un gel de polyacrylamide contenant du sodium dodécyl-sulfate (SDS-PAGE) qui permet de maintenir les protéines linéaires avec une charge globale fortement négative. Un marqueur de poids moléculaire (Fermentas) est déposé en même temps que les échantillons. La réticulation du gel permet une séparation uniquement en fonction de la taille des protéines. Le gel est mis dans une cuve remplie de tampon de migration Laemmli 1x. Une fois les échantillons dans les puits, le gel est mis sous influence d'un champs électrique de 150 V durant 45 min, qui va déplacer les protéines vers la cathode.

Le gel SDS-PAGE est transféré sur une membrane de nitrocellulose (GE HEALTH CARE) ou de PVDF (GE HEALTH CARE) hydratée respectivement au préalable avec du tampon de migration et du méthanol, le tout est pris en sandwich entre deux plaques de papier Whatman hydratées au tampon de migration. Le sandwich est recouvert avec les éponges du système et le tout est maintenu durant le transfert par des pinces en plastiques. Le transfert s'effectue dans une cuve où le gel et la membrane sont complètement immergés dans du tampon de transfert, maintenu à 4°C sous un courant de 200 mA pendant 60 min. La plus grande partie des protéines est transférée sur la

membrane et prête pour l'immunodétection.

Gel de polyacrylamide contenant du SDS à 8 ou 10%.

La solution du gel de séparation contient 8 ou 10 % (masse (g):volume (V)) d'un mélange d'acrylamide et de bis acrylamide dans un rapport de 29:1, 375 mM de Tris-HCl à pH = 8,8, 33,3 mg.l-1 d'amonium per sulfate, 0,1% (g:V) de SDS, et 6,7x10^{-4} ml de TEMED pour 1 ml de solution.

La solution du gel de concentration contient 5% (g:V) d'un mélange d'acrylamide et de bis acrylamide dans un rapport de 29:1, 125 mM de Tris-HCl à pH = 6,8, 50 mg/L d'amonium per sulfate, 0,1% (g:V) de SDS et 1x10^{-3} ml de TEMED pour 1 mL de solution.

Tampon Laemmli 1x :

La solution de Tris Base 25 mM contient 192 mM de glycine, 0,1% (g:V) de SDS pour 1l d'eau distillée.

Tampon de transfert 1x :

La solution de tampon de transfert contient 800 ml de tampon Laemmli 1 fois concentrée et 200 ml de méthanol.

2.9.4 Révélation des protéines

Une fois les protéines transférées sur la membrane, elle est saturée avec une solution Sat1 (TBS-0,1% Tween 20 avec 5% de lait écrémé) ou S2 (50% de TBS-0,1% Tween 20 et 50% de tampon ODYSSEY.) pendant 45 min à température ambiante.

Après le blocage, l'anticorps primaire dilué dans la solution S1(TBS-0,1% Tween 20 avec1% de lait écrémé) ou S2 est incubé avec la membrane pendant 60 min à 20-25°C ou à 4°C pendant 12 heures. La membrane est ensuite rincée par trois bains de TBS-0,1% Tween 20 de chacun 3 min.

L'anticorps secondaire est dilué dans la solution S1 ou S2 et incubé pendant 45 min à 20-25°C. L'anticorps secondaire est lavé dans 3 bains de TBS-0,1% Tween 20 pendant 3 min chacun. Ensuite, le Tween 20 est éliminé par trois bains de TBS 1 fois concentré pendant 3 min chacun.

Dilution des anticorps primaires :

1. Anticorps de lapin contre la myotubularine 2347 et 2348 (Buj-Bello et al., 2008): 1:2000.
2. Anticorps de lapin contre MTMR2 2224 (Buj-Bello, non publié): 1:2000.
3. Anticorps de souris contre la GAPDH (Sigma, WH0002597M1) : 1:10 000 à 1:25 000.
4. Anticorps de souris contre l'α-tubuline (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, sc-5286) :

1:2000.

Dilution des anticorps secondaires :

1. Anticorps de chèvre contre le lapin couplé au fluorophore 800 nm (Licor) : 1:10 000.
2. Anticorps de chèvre contre la souris couplé au fluorophore 700 nm (Licor) : 1:10 000.

2.9.5 Analyse

Une fois la membrane recouverte par les différents anticorps, elle est déposée dans l'ODYSSEY (Licor) qui va permettre de détecter les fluorophores couplés aux anticorps secondaires et quantifier le signal de fluorescence. Le système ODYSSEY permet une quantification des protéines plus fiable que la chimie-luminescance car les anticorps secondaires sont couplés à un nombre défini de fluorophore et le système ODYSSEY permet de compter le nombre de photon émis par le fluorochrome. Le nombre de photon émis est donc directement proportionnel à la quantité de protéine.

Le signal émis par les différentes bandes est normalisé, en premier, par rapport au bruit de fond de la membrane. En second, l'intensité lumineuse de la protéine d'intérêt est normalisée par l'intensité de la bande de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ou l'α-tubuline.

Le rapport des intensités lumineuses pour chaque échantillon d'une même membrane est ensuite exprimé par rapport à un échantillon de référence. Cet échantillon se trouve sur toutes les membranes analysées et va servir de normalisateur entre les membranes. Les quantités d'MTMR2 dans chacun des échantillons sont normalisées par la quantité d'α-tubuline.

Enfin les rapports d'intensité lumineuse normalisée entre les différentes membranes sont exprimés par rapport à la moyenne des échantillons contrôles qui constituent la référence physiologique de l'expérience. Les différences de quantité de protéines sont donc directement visibles sur le graphique.

2.10 Extraction d'acide nucléique

2.10.1 Extraction d'ARN :

La méthode du Trizol.

L'ARN est extraite des coupes histologiques provenant des muscles congelés grâce au réactif TRIZOL (GIBCO) en suivant les instructions du fabriquant.

Huit cent microlitres de TRIZOL sont ajoutés sur les coupes non décongelées. Les coupes sont incubées à température ambiante et dissoutes à la pipette 1000. Du glycogène liquide est ajouté au mélange à une concentration finale de 0,25 g/l et le tout est incubé à température ambiante pendant 5 min. Deux cent microlitres de chloroforme sont ajoutés sur le Trizol. La solution est incubée 2 min à température ambiante après agitation manuelle de 20 secondes. Les tubes sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 min à 4°C pour séparer la phase aqueuse de la phase organique du phénol-chloroforme. La phase aqueuse supérieure est transférée dans un nouveau tube, dans lequel 500 µl d'isopropanol sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé manuellement pendant 20 secondes et incubé à température ambiante pendant 10 min. Les étapes suivantes sont réalisées sur la glace ou à 4°C. La solution est centrifugée à 12 000 g pendant 8 min. Le surnageant est éliminé et le culot est rincé avec 1 ml d'éthanol à 75% froid. Le tube est centrifugé à 5 000 g pendant 5 min à 4°C. Le lavage est renouvelé une fois. Le culot est asséché à température ambiante pendant 10 min, puis redissout dans 15 µl d'eau ultra pure ou DEPC et incubé pendant 60 min à 4°C.

Les ARN sont dosés avec un spectrophotomètre à l'absorbance de 260 nm et 280 nm pour déterminer la concentration de l'acide nucléique. Le rapport des absorbances 260/280 nm détermine la pureté de l'échantillon par rapport aux contaminants protéiques. Un échantillon de bonne qualité à un rapport qui s'approche de la valeur 2. La qualité physique des ARN est évaluée sur gel d'agarose ce qui permet de visualiser l'intégrité des principales populations d'ARN. Un microgramme d'ARN total est dilué dans 10 µl de bleu de charge 1 fois concentré et déposé sur un gel d'agarose avec 1%-gel Red à 1:10 000, dans du TAE concentré 1x. Les échantillons sont mis à migrer pendant 15 min à 100 V. Les bandes sont révélées aux UV. L'ARN est conservé à -80°C.

La bande d'intensité la plus faible avec le plus haut poids moléculaire est constituée des ARN messagers et non codants. Les deux bandes principales, de forte intensité, sont les ARN ribosomiques 28S et 18S. La plus petite bande est constitué des ARNt et 5S. La présence d'un smire à la place de bandes bien distinctes indique une dégradation des ARN avant ou durant l'extraction. La présence de bandes claires et bien séparées indique un ARN de bonne qualité.

2.11 Quantification de l'expression génique

2.11.1 Traitement à la DNAse

La réaction de DNAse I permet d'éliminer l'ADN résiduel qui a été purifiée en même temps que l'ARN. L'étape de DNAse est réalisée sur 1 µg d'ARN totale grâce au kit de Promega.
Un microlitre de tampon de DNAse I plus un microlitre d'enzyme sont ajouté au 10 µl contenant le microgramme d'ARN. La solution est incubée à 37°C pendant 20 min. L'inactivation de la DNAse I est réalisée avec l'ajout 1 µl de solution d'inactivation dans l'échantillon, et le tout est incubé 2 min à température ambiante. Le mélange est centrifugé à 10 000 g pendant 1 min et les 10 µl de surnageant sont transférés dans des tubes pour PCR de 200 µl.

2.11.2 Reverse transcription

La reverse transcription permet de transformer l'ARN en ADN simple brin complémentaire grâce à la reverse transcriptase.
Les 10 µl d'échantillon sont incubés à 65°C pendant 5 min après, addition d'un µl d'une solution contenant 50 à 250 ng d'amorce « random » dans un volume d'un µl maximum et 1 µl de dNTP à 10 mM. Les échantillons sont rapidement refroidit sur la glace. Huit microlitres d'une solution contenant 4 µl de tampon de reverse transcription concentré 5 fois, 2 µl de DTT à 0,1 M, 1 µl de RNAse OUT et 1 µl de SuperScript II (Sigma) ou 1 µl d'eau DEPC pour le témoin de réaction. Les échantillons sont incubés à 42°C pendant 50 min puis à 70°C pendant 15 min.

2.11.3 PCR quantitative

La PCR quantitative (QPCR) est basée sur le principe de détection de l'amplification de l'ADN en temps réel. La quantité d'ADN est visualisée grâce au SYBR GREEN qui lorsqu'il est intercalé entre les brins d'ADN, émet de la fluorescence après stimulation. La fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN formée. Le modèle théorique de la PCR veut qu'à chaque cycle de PCR, deux nouveaux brins soient synthétisés pour un brin matrice, produisant ainsi une multiplication exponentielle. La quantité d'ADN de départ joue un rôle important pour la

duplication exponentielle car pour de faible quantité d'ADN, la duplication exponentielle n'apparaît qu'au bout d'un certain nombre de cycles de PCR. Le cycle de PCR correspondant au démarrage de la duplication d'ADN exponentielle est appelé Cq pour cycle de quantification (Hellemans et al., 2007). Les Cq sont valables lorsqu'ils sont compris entre 20 et 30. Le répliqua est valable quand l'écart type des Cq ne dépasse pas 0,2.

La première étape dans la PCR quantitative est l'optimisation des amorces. L'optimisation permet de définir deux facteurs. Le premier est le rendement de PCR du couple d'amorce sens et anti-sens choisit pour le gène d'intérêt et de référence. L'efficacité est déterminée sur une gamme de dilution unique avec plusieurs combinaisons de concentration d'amorce qui vont de 1 µM à 4 µM (Adaptation du protocole de Nolan 2006 (Nolan et al., 2006). Le deuxième facteur permet de déterminer la quantité d'échantillon totale minimale pour avoir une amplification génique comprise entre les Cq 20 à 30. Cette méthode permet d'avoir des échantillons compris dans la gamme d'évaluation de l'efficacité de PCR des amorces.

La QPCR est réalisée dans volume totale de 25 µl contenant 7,5 µl de Master Mix SYBR GREEN 2x (Applied biosystems), 2,5 µl d'amorce sens entre 1 µM et 4 µM, 2,5 µl d'amorce anti-sens entre 1 µM et 4 µM, 2,5 µl d'eau milliQ stérile et 10 µl d'ADNc dilué à la quantité voulue. Chaque échantillon est réalisé en double pour la quantification des échantillons et en triple pour établir l'efficacité de PCR des amorces. Chaque QPCR est réalisée avec un échantillon contrôle de la reverse transcription et un échantillon contrôle de la QPCR. La QPCR est réalisée en plaque 96 puits sur ABI prisme d'Applied biosystems 7900HT selon le protocole suivant :

1. Dénaturation : 95°C pendant 900 sec.
2. Amplification de 40 cycles :
    1. Dénaturation : 95°C pendant 15 sec.
    2. Hybridation : 60°C pendant 30 sec.
    3. Élongation : 60°C pendant 30 sec.
3. Courbe de fusion :
    1. 95°C pendant 15 sec.
    2. 60°C pendant 15 sec.
    3. Monté graduelle de 0,1°C/s jusqu'à 95°C avec enregistrement constant de la fluorescence.

La courbe de fusion permet de visualiser la spécificité de production de la PCR. En effet l'amplicon spécifique a une taille définie, entre 100 et 200 pb, et donc une température de fusion spécifique. La

montée graduelle en température permet de mesurer la perte de fluorescence correspondant à la température de fusion de l'amplicon spécifique, mais également des amplicons aspécifiques, s'il y en a. La technique permet de détecter la présence de contaminants dans les échantillons contrôles, et la présence de dimérisation des amorces entres elles.

Cq : cycle de quantification (Hellemans et al., 2007).

2.11.4 Analyse

L'analyse de l'expression des gènes d'intérêt se fait par rapport à un gène de référence qui lui ne varie pas et assume que l'efficacité de PCR est de 100% donc la quantité d'ADN est calculées par la formule :

$$NRQ = 2^{\Delta\Delta Cq}$$

L'approximation d'une efficacité de PCR de 2 a été corrigée par Pfaffl en 2001 pour intégrer l'efficacité réelle des amorces ((Nolan et al., 2006) ; (Al-Qusairi et al, 2009)). La formule devient :

$$NRQ = \frac{\left(E_{GI}\right)^{\Delta Cq_I (EC-EI)}}{\left(E_{GRef}\right)^{\Delta Cq_{Ref} (EC-EI)}}$$

L'absence de variation du gène de référence est également théorique (Pfaffl, 2001) et l'utilisation de plusieurs gènes de référence permet une meilleure évaluation de l'expression d'un gène d'intérêt ((Hellemans et al., 2007) et (Pfaffl, 2001)). La formule devient :

$$NRQ = \frac{\left(E_{GI}\right)^{\Delta Cq_I (EC-EI)}}{\sqrt[f]{\prod_{o}^{f} \left(E_{GRef_o}\right)^{\Delta Cq_{Ref_o} (EC-EI)}}}$$

Une fois les NRQ calculés pour chaque échantillon d'intérêt, les échantillons traités différemment sont exprimés en fonction de la moyenne des échantillons provenant des souris contrôles.

NRQ = quantité relative normalisée.

EGI = efficacité des amorces du gène d'intérêt.

EGRef = efficacité des amorces du gène de référence.

ΔCqI = différence entre le cycle de quantification pour le gène d'intérêt dans l'échantillon de

référence avec le cycle de quantification pour le gène d'intérêt dans l'échantillon d'intérêt.

ΔCqRef = différence entre le cycle de quantification pour le gène de référence dans l'échantillon de référence avec le cycle de quantification pour le gène de référence dans l'échantillon d'intérêt.

EC = échantillon contrôle ou de référence.

EI = échantillon d'intérêt.

2.12 Evaluation fonctionnelle

(Réaliser par le service d'évaluation fonctionnelle de Généthon)

2.12.1 Test : Activité

Le test d'activité est un test spontané qui permet d'évaluer la mobilité générale de la souris et indirectement la force de la souris. Les différents paramètres sont mesurés par le moniteur d'activité LE 8811 IR déjà décrit (Lostal et al., 2010) durant une période de 90 min. La souris est placée dans une boite ouverte sur le dessus équipée de laser permettant la détection des mouvements en trois dimensions. Les souris sont isolées du bruit et de la lumière environnante mais l'intérieur de la boite est éclairée avec une lumière blanche et correctement ventilée. Les paramètres analysés sont les suivants :

1. L'activité de la souris qui est le pourcentage de temps pendant lequel la souris bouge sur la durée totale de l'expérience.
2. La distance parcourue par la souris durant l'expérience.
3. La vitesse maximale de la souris.
4. Le nombre de redressement sur les pattes arrières.

LE 8811 IR motor activity monitor (Bioseb, Chaville, France).

2.12.2 Le test d'échappement

Le test d'échappement ou « escape test » permet de mesurer la force globale de la souris de façon forcée sans avoir recourt à une méthode invasive (Carlson et al., 1990).

La souris est placée sur une plateforme, face à un tube qui fait 30 cm de long. La queue de la souris est reliée à un dynamomètre fixe qui permet de mesurer la force. Après une forte stimulation la

souris s'échappe dans le tube qui fait face au dynamomètre et provoque un pic de force qui est enregistré. Le pic de force maximale et la moyenne des 5 pics maximaux sont normalisés par le poids de l'animal.

2.12.3 Force isolée

La mesure de la force isolée du muscle permet d'évaluer in vitro les propriétés contractiles d'un muscle. La méthode est appliquée au muscle EDL et Soléaire.

Les souris sont anesthésiées avec une solution de pentobarbitale (50 $mg.kg^{-1}$) permettant de garder une irrigation des muscles pendant la dissection. Après la dissection les souris sont euthanasiées par élongation cervicale.

Les muscles sont prélevés entiers et sans tissus connectifs. Ils sont maintenus dans une solution de Krebs oxygéné pendant 40 min à 20°C pour que les tissus s'équilibrent.

Les muscles sont connectés par un côté à une accroche électromagnétique qui permet de régler la tension qui s'exerce sur le muscle et de l'autre côté à un dynamomètre. Le muscle est stimulé directement par des électrodes qui sont situées parallèlement à ce dernier.

Les contractions isométriques répétées et tétaniques musculaires sont enregistrées à L0. L0 est la distance de tension musculaire pour laquelle la force isométrique tétanique est observée. Pour pouvoir comparer les forces entre les différentes expériences, elles sont normalisées par l'aire maximale transversale du muscle (ou CSA). La force isométrique est calculée en divisant la force par la CSA du muscle.

La normalisation se base sur le principe que les muscles ont une forme cylindrique et une densité de 1,06 $mg.mm^{-3}$ et que la CSA correspond au poids du muscle mouillé divisé par la taille des fibres (Close, 1972).

Solution de Krebs :

1. NaCl = 118 mM.
2. NaHCO3 = 25 mM.
3. KCl = 5 mM.
4. KH2PO4 = 1 mM.
5. $CaCl_2$ = 2,5 mM.
6. MgSO4 = 1 mM.
7. Glucose = 5 mM.

8. Oxygénation = 95% O2 + 5% CO2.

2.12.4 Survie

La courbe de survie des souris est calculée sur des périodes de 7 jours. La semaine est validée si et seulement si la souris est en vie durant toute la période. La période est égale à 1. La mort en début ou en fin de semaine invalide la période de temps qui devient égale à 0.

Le taux de survie est calculé avec la formule suivante :

$$TS_t = \frac{\sum n_1 + \sum n_0}{\sum n_{Tot}} \times 100$$

TSt = taux de survie durant la période t exprimé en pourcentage.

n1 = souris en vie.

n0 = souris morte.

nTot = nombre de souris au départ.

Le graphique de la survie représente en abscisse le temps et en ordonnée le pourcentage de survie. Le début de la courbe de survie représente la date d'inclusion des souris dans le protocole, c'est-à-dire, la date d'injection des souris.

2.12.5 Poids

Le poids des souris mutantes est mesuré 3 fois par semaine, quelque soit leur devenir, afin de permettre aussi une évaluation de leur état de santé. Le poids des souris reporté sur la courbe représente celui mesuré tous les 7 jours car le poids des souris contrôles (WT) ne se fait qu'une fois par semaine.

Le poids moyen au temps t est obtenu avec la formule suivante :

$$\bar{P}_t = \frac{\sum_1^i n_i}{n} \qquad ET = \frac{\sum_1^i n_i - \bar{n}}{n} \qquad ErrT = \frac{\sum_1^i n_i - \bar{n}}{n * \sqrt{n}}$$

$\bar{P}_t$ = poids moyen au temps t.

ET = écart type.

ErrT = Erreur type.

ni = échantillon i.

n = nombre totale d'échantillon.

$\bar{n}$ = moyenne des échantillons.

2.12.6 Analyse statistique

Les analyses statistiques sont réalisées sur l'ANOVA ou comparaison de la variance entre, au minimum, les trois groupes suivants : contrôle, mutant contrôle et mutant traité. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel SigmaStat3.

Tous les groupes d'échantillons sont considérés comme indépendants les un des autres. L'hypothèse de départ H0 est de comparer les différents groupes d'échantillons entre eux et de déterminer si ils ont la même variance. L'hypothèse H1 est que les variances sont différentes. Les tests qui donnent une valeur de p inférieure à la norme (0,05), validant l'hypothèse H1, sont représentés sur les graphiques. Les autres cas représentent la validation de H0 ou l'impossibilité de réaliser le test par manque d'effectif.

Le test de normalité pratiqué est celui de Kolmogorov-Smirnov. Il sert à identifier si les échantillons suivent une distribution normale ou non. Si le test est positif, il est suivit d'un test de Holm-Sidak qui permet de comparer les groupes deux à deux afin de voir qu'elles paires sont différentes. Si le test de Kolmogorov-Smirnov est négatif, une analyse de la variance ordonnée est réalisée avec la méthode de Kruskal-Wallis. Ensuite, la comparaison des différentes paires de groupes est réalisée par la méthode de Dunn.

3 Résultats

3.1 Développement du traitement de la myopathie myotubulaire par la thérapie génique

Le premier essai dans le traitement de la myopathie myotubulaire a démontré l'efficacité du transgène MTM1 pour corriger la pathologie musculaire, mais également la nécessité de contrôler de la quantité de protéine transgénique produite par le vecteur de thérapie génique (Buj-Bello et al., 2008). Le développement du traitement de la myopathie myotubulaire passe par la démonstration de la capacité du transgène MTM1 à guérir l'ensemble de l'organisme malade. Cette étape importante doit prendre en compte la nécessité du contrôle de la production de protéine transgénique dans le muscle. La stratégie pour contrôler le niveau de protéine consiste à utiliser le promoteur minimal de la desmine humaine (Li et al., 1993) en amont du transgène MTM1, décrit précédemment (Buj-Bello et al., 2008). La nouvelle cassette thérapeutique ainsi obtenue, va servir pour le développement du traitement de la myopathie myotubulaire et permettre de réduire les doses de vecteur thérapeutique nécessaires.

3.1.1 Étude du fonctionnement et de l'efficacité de la nouvelle cassette thérapeutique Des-MTM1 sur le muscle de souris atteint de myopathie myotubulaire

Les deux études sont réalisées avec le vecteur AAV1-DES-MTM1, résultant de l'encapsidation de la nouvelle cassette thérapeutique DES-MTM1 dans le sérotype 1 des AAV, sur les deux modèles murins de la myopathie myotubulaire : le mutant muscle spécifique (mKO) et le mutant complet (KO). La réalisation des expériences sur un deuxième modèle animal permet de conforter les résultats obtenus dans le premier. Le vecteur AAV1-DES-MTM1 est injecté à une dose de $3{,}5 \times 10^9$ vg dans le muscle tibialis antérieur (TA) et une dose de $1{,}75 \times 10^9$ vg dans l'extensor digitorum longus (EDL) de souris, KO et mKO, âgées de, respectivement, 3 et 4 semaines.

Fonctionnalité de la cassette DES-MTM1.

Le fonctionnement de la cassette thérapeutique est déterminé par détection de la protéine transgénique dans le muscle mutant injecté avec le vecteur AAV1-DES-MTM1.

La technique du western blot montre que le niveau de la protéine transgénique est supérieur au niveau endogène de myotubularine, 2 semaines après l'injection du vecteur chez le mutant KO (Figure 14A). Chez le mutant mKO, 4 semaines après l'injection du vecteur, cette même technique montre que le niveau de la protéine transgénique est très supérieur au niveau de myotubularine endogène (Figure 15A).

La présence de la protéine transgénique dans le muscle mutant démontre que le promoteur desmine permet l'expression du transgène dans le muscle mutant.

Efficacité de la cassette thérapeutique sur la pathologie musculaire.

La pathologie musculaire de la myopathie myotubulaire, chez la souris, peut-être étudiée par l'intermédiaire de trois principaux critères. Le premier des critères est la masse musculaire, qui est mesurée par le poids des muscles, le diamètre moyen et le profil de répartition des myofibres. Le second est l'histologie générale, et le dernier est la force individuelle du muscle. L'efficacité de la protéine thérapeutique au niveau de la pathologie musculaire est quantifiée grâce à ces trois critères, à 2 et 4 semaines après l'injection du vecteur AAV1-DES-MTM1 chez, respectivement, le mutant KO et mKO.

La masse musculaire est évaluée par l'intermédiaire du poids moyen, de l'aire ou du diamètre moyen des myofibres et du profil de répartition de ces dernières en fonction de leur taille. Le poids moyen du TA mutant KO (KO-PBS) est considérablement réduit par rapport au muscle normal (WT) (Figure 14D). La taille moyenne des myofibres du TA mutant KO, qui reflète la variation de la masse musculaire, est également très réduite (Figure 14F). Le profil de répartition des myofibres selon leur taille montre une réduction importante des fibres de grande taille au profit des myofibres de petite taille (Figure 14G). Le TA mutant mKO (mKO-PBS) présente les mêmes caractéristiques au niveau du poids moyen (Figure 15D), de la taille moyenne des myofibres (Figure 15F) et du profil de répartition des myofibres (Figure 15G) que le muscle mutant KO. La présence de la protéine transgénique dans le muscle TA KO (KO-AAV) permet de corriger le poids (Figure 14D), la taille moyenne (Figure 14F) et le profil de répartition des myofibres (Figure 14G). Les mêmes

résultats sont retrouvés chez le muscle mutant mKO (mKO-AAV) contenant la protéine transgénique (Figure 15D-15F-15G).

L'histologie des muscles est évaluée grâce aux colorations hématoxyline-éosine et NADH-TR, sur des coupes transversales de TA, et à la mesure du taux de noyaux internalisés dans les myofibres. Le muscle mutant KO contient des fibres musculaires dont la structure interne et les organelles, telles que les mitochondries et le réticulum sarcoplasmique, sont désorganisées par rapport au muscle normal (Figure 14B). Le muscle mutant mKO présente le même type de désorganisation (Figure 15B). Le taux de noyaux internalisés dans le muscle mutant KO n'est pas significativement différent du taux du muscle normal (Figure 14E). En revanche, chez le mutant mKO, le taux de noyaux internalisés est plus important que la normale (Figure 15E). La protéine thérapeutique corrige l'histologie des myofibres malades dans le muscle mutant KO et mKO (Figure 14B ; Figure 15B), ainsi que le taux de noyaux internalisés chez le mutant mKO (Figure 15E). L'immunodétection de la myotubularine sur des coupes transversales de TA KO et mKO, contenant la protéine transgénique (Figure 15C, Figure 15C), met en évidence une localisation de la protéine principalement au niveau de la membrane plasmique et plus faiblement dans le cytoplasme.

La force individuelle musculaire est obtenue grâce à la mesure de la force de l'EDL. Les EDL mutants KO et mKO perdent environ 80% de force par rapport au muscle normal (Figure 14H ; Figure 15H). La protéine thérapeutique corrige complètement la force des muscles mutants KO (Figure 14H) et presque entièrement la force des muscles mutants mKO (Figure 15H).

En conclusion, les résultats des expériences de western blot démontrent que la cassette thérapeutique DES-MTM1 est fonctionnelle. L'analyse de la morphologie et de la fonction musculaire montre que la cassette thérapeutique est efficace pour corriger le phénotype musculaire de la myopathie myotubulaire.

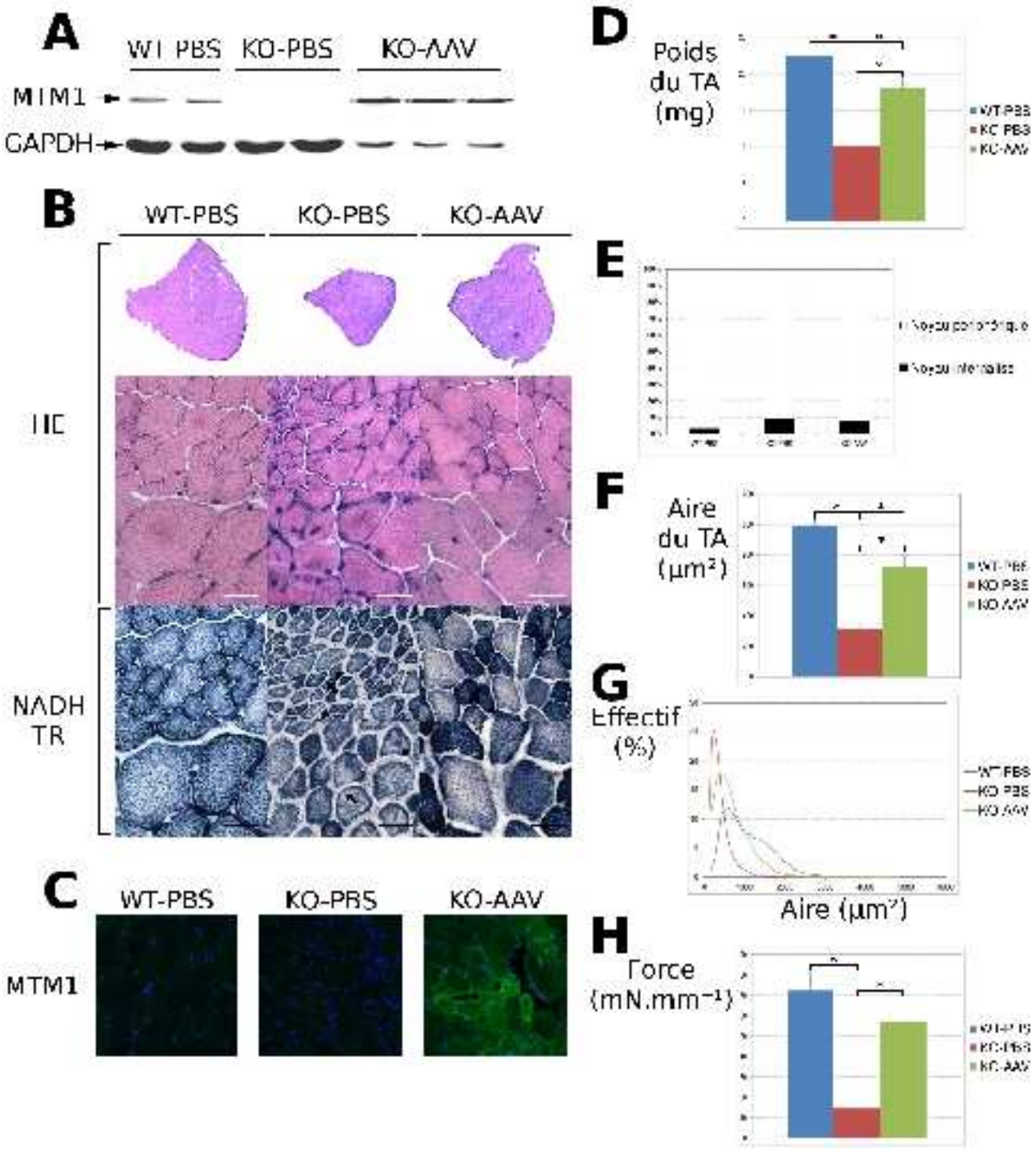

A
WT-PBS
KO-PBS
KO-AAV
MTM1
GAPDH
B
WT-PBS
KO-PBS
KO-AAV
HE
NADH TR
C
WT-PBS
KO-PBS
KO-AAV
MTM1
D
Poids du TA (mg)
E
F
Aire du TA (µm²)
G
Effectif (%)
Aire (µm²)
H
Force (mN.mm⁻¹)

Figure 14 : Analyse de l'expression et de l'effet du nouveau vecteur AAV1-DES-MTM1 sur le muscle déficient en myotubularine KO après 2 semaines d'expression.

A/ Quantification du niveau de myotubularine (bande du haut) et de GAPDH (bande du bas) par western blot sur des extraits de protéines totales provenant de muscles normaux (WT-PBS : n = 2), mutants contrôles (KO-PBS : n = 2) et injectés avec le vecteur (KO-AAV : n = 3). **B/** Histologie des muscles TA mutants injectés avec le vecteur (KO-AAV : n = 3), mutants contrôles (KO-PBS : n = 3) et normaux (WT-PBS : n = 3). *Images du haut* : macroscopies de coupes transversales de TA après coloration à l'hématoxyline-éosine. *Images du milieu* : agrandissements de coupes transversales de TA colorées à l'hématoxyline-éosine. *Images du bas* : agrandissements de coupes transversales de TA colorées au NADH-TR. Regroupement des mitochondries principalement à la périphérie (flèche) de la myofibre et au centre (tête de flèche). Les barres d'échelle représentent 25 µm. **C/** L'immunolocalisation de la myotubularine dans le TA mutant injecté avec le vecteur (KO-AAV : n = 3), mutant contrôle (KO-PBS : n = 3) et normal (WT-PBS : n = 3). Les barres d'échelle représentent 25 µm. **D/** Le poids moyen des muscles TA provenant des muscles normaux (WT-PBS : n = 4), dépourvus de myotubularine (KO-PBS : n = 4) et mutant injecté avec le vecteur (KO-AAV : n = 4) ; (* = P < 0,05). **E/** Dénombrement de la proportion des noyaux internalisés dans le TA mutant injecté avec le vecteur (KO-AAV : n = 5), le muscle mutant contrôle (KO-PBS : n = 3) et normal (WT-PBS : n = 4). **F/** Quantification de l'aire moyenne des myofibres dans le TA mutant injecté avec le vecteur (KO-AAV : n = 3), mutant contrôle (KO-PBS : n = 5) et normal (WT-PBS : n = 4), (* = P < 0,05). **G/** Profil de répartition des myofibres en fonction de leur taille dans le muscle mutant injecté avec le vecteur (KO-AAV : n = 8284), mutant contrôle (KO-PBS : n = 11407) et normal (WT-PBS : n = 8605). H/ Mesure de la force isolée du muscle EDL mutant injecté avec le vecteur (KO-AAV : n = 3), mutant contrôle (KO-PBS : n = 4) et normal (WT-PBS : n = 6) (* = P < 0,05).

DES = desmine.

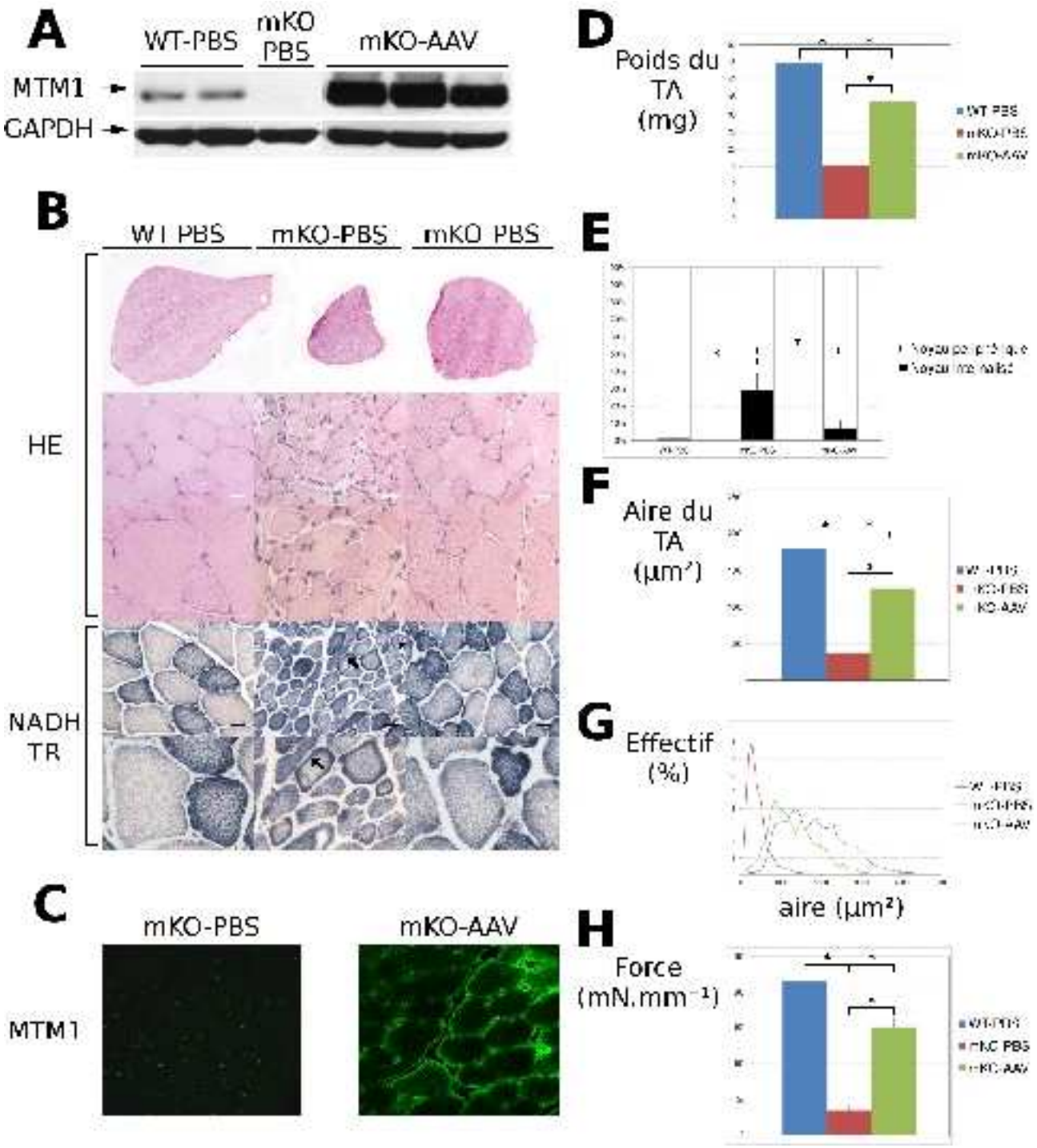

A
WT-PBS
mKO PBS
mKO-AAV
MTM1
GAPDH
B
WT PBS
mKO-PBS
mKO PBS
HE
NADH TR
C
mKO-PBS
mKO-AAV
MTM1
D
Poids du TA (mg)
E
F
Aire du TA (µm²)
G
Effectif (%)
aire (µm²)
H
Force (mN.mm⁻¹)

Figure 15 : Analyse de l'expression et de l'effet du nouveau vecteur AAV1-DES-MTM1 sur le muscle déficient en myotubularine mKO après 4 semaines d'expression.

A/ Quantification du niveau de myotubularine (bande du haut) et de la GAPDH (bande du bas) par western blot dans des extraits protéiques provenant de TA mutants injectés avec le vecteur (mKO-AAV : n = 3), mutants contrôles (mKO-PBS : n = 3) et normaux (WT-PBS : n = 3). **B/** Histologie des TA mutants injectés avec le vecteur (mKO-AAV : n = 3), mutants contrôles (mKO-PBS : n = 3) et normaux (WT-PBS : n = 3). *Images du haut* : macroscopies de coupes transversales de TA après coloration à l'hématoxyline-éosine. *Images du milieu* : agrandissements de coupes transversales de TA colorées à l'hématoxyline-éosine. *Images du bas* : agrandissements de coupes transversales de TA colorées au NADH-TR. Flèche : regroupement de mitochondries et de réticulum sarcoplasmique (RS) à la périphérie de la myofibre. Tête de flèche : regroupement de mitochondries et de RS au centre de la myofibre. Les barres d'échelle représentent 25 µm. **C/** L'immunolocalisation de la myotubularine sur des couples transversales de TA mutants injectés avec le vecteur, mutants contrôles et normaux. **D/** Poids moyen des muscles mutants injectés avec le vecteur (mKO-AAV : n = 9), mutants contrôles (mKO-PBS : n = 15) et normaux (WT-PBS : n = 13), (* = P < 0,05). **E/** Dénombrement de la proportion des noyaux internalisés sur des coupes transversales provenant de TA mutants injectés avec le vecteur (mKO-AAV : n = 3), mutants contrôles (mKO-PBS : n = 3) et normaux (WT-PBS : n = 2), (* = P < 0,05). **F/** Quantification de l'aire moyenne des myofibres dans le muscle mutant injecté avec le vecteur (mKO-MTM1 : n = 3), mutant contrôle (mKO-PBS : n = 3) et normal (WT-PBS : n = 4), (* = P < 0,05). **G/** Profil de répartition des myofibres en fonction de leur taille dans le muscle mutant injecté avec le vecteur (mKO-AAV : n = 1636), mutant contrôle (mKO-PBS : n = 2997) et normal (WT-PBS : n = 3326), (* = P < 0,05). H/ Mesure de la force isolée du muscle EDL mutant injecté avec le vecteur (mKO-MTM1 : n = 3), mutant contrôle (mKO-PBS : n = 4) et normal (WT-PBS : n = 5), (* = P < 0,05).
DES = desmine.

3.1.2 Preuve de concept de l'efficacité du traitement de thérapie génique sur l'ensemble de l'organisme murin atteint de myopathie myotubulaire

L'étape suivante dans le développement du traitement de thérapie génique pour la myopathie myotubulaire est d'apporter la preuve que le transgène MTM1 est capable d'atteindre et de corriger l'ensemble des muscles de l'organisme atteint par la myopathie myotubulaire. La preuve de concept est démontrée par injection intraveineuse du vecteur AAV9-DES-MTM1 chez les deux modèles de la myopathie myotubulaire. L'étude a donné lieu à une publication : « *Gene replacement therapy for myotubularin deficiency prolongs survival and restores muscle function in murine and canine models of X-linked myotubular myopathy* » (Annexe 2 ; soumis à publication dans (Science Translational Medicin)). La spécificité tissulaire du vecteur est déterminée par mesure du niveau de protéine thérapeutique dans différents organes. La publication inclut également la preuve que la cassette thérapeutique, contenant le promoteur de la desmine et l'ADNc de la myotubularine canine, est capable de corriger localement le phénotype musculaire du chien atteint de myopathie myotubulaire.

3.1.3 Effets du vecteur AAV9-DES-MTM1 sur le modèle murin de la myopathie myotubulaire

Le vecteur AAV9-DES-MTM1 est obtenu par encapsidation de la cassette thérapeutique DES-MTM1, dont la validité a été établie précédemment, dans le sérotype 9 des AAV. Le vecteur va permettre de tester la capacité thérapeutique de la cassette DES-MTM1 sur l'organisme des souris mutantes KO et mKO. Ces expériences vont également permettre de tester la deuxième partie de la stratégie visant à contrôler la quantité de protéines transgéniques, qui consiste à réduire la dose de vecteur injectée chez la souris.

Analyse de la présence de la protéine transgénique dans le muscle mutant.

La première étape pour étudier les effets du vecteur AAV9-DES-MTM1 sur l'organisme murin atteint par la myopathie myotubulaire est de démontrer la présence de la protéine dans un panel représentatif de muscles. Cette étape permet également de démontrer que la réduction de dose de vecteur influence la diminution de la quantité de protéine transgénique produite dans le muscle mutant. Le vecteur AAV9-DES-MTM1 est injecté par voie intraveineuse à une dose de $3x10^{13}$ $vg.kg^{-1}$ dans le modèle KO âgé de 3 semaines et à une dose de $0,5x10^{13}$ $vg.kg^{-1}$ dans le modèle mKO âgé de 4 semaines.

Les différents muscles analysés par Western Blot, chez le mutant KO, à 15 jours et 6 mois après l'injection du vecteur, contiennent une quantité de la protéine transgénique plus importante que la quantité physiologique (Annexe 2, tableau 1). L'analyse par Western Blot du panel représentatif de muscles, chez le mutant mKO, à 1,5 et 12 mois après l'injection du vecteur, montre une quantité de la protéine transgénique équivalente au niveau endogène de myotubularine (Annexe 1, tableau 1).

Le vecteur AAV9-DES-MTM1 permet une expression de la protéine transgénique dans l'ensemble des muscles mutants après injection intraveineuse. La réduction de dose de vecteur entre les deux modèles permet de diminuer, jusqu'à un niveau physiologique, la quantité de protéine transgénique produite.

Les effets du vecteur AAV9-DES-MTM1 sur l'organisme malade.

Une fois la confirmation que la protéine transgénique est présente dans l'ensemble des muscles de l'organisme, ces effets sur l'organisme malade sont évalués de façon globale grâce au taux de survie, au suivi du poids de l'animal, à l'étude du comportement et à la mesure de la force globale. Les effets de la protéine transgénique sur la masse musculaire sont étudiés sur un panel représentatif de muscles. Les effets de la protéine transgénique sur la désorganisation musculaire sont étudiés dans le TA, à l'aide des différentes mesures décrites précédemment et l'introduction d'un nouveau critère d'évaluation : le marquage de la dysferline et du DHPR1α.

Durant l'expérience, les souris mutantes KO et mKO ont un taux de survie très réduit par rapport aux souris normales. Leur poids stagne rapidement, dans un premier temps, puis diminue quelques semaines après le début de l'expérimentation, contrairement aux souris normales qui prennent du poids en continu durant l'expérience. Les souris KO et mKO ayant reçus le vecteur retrouve un taux

de survie et un développement similaires aux souris normales durant toute l'expérience (Annexe 2, tableau 1).

Les souris mutantes KO, 15 jours après le début de l'expérience ont une mobilité et une force globale réduites par rapport aux souris contrôles. Chez le modèle mKO, la mobilité et la force globale des souris est considérablement réduite par rapport aux souris contrôles 1,5 mois après le début de l'expérience. La présence de la protéine transgénique chez les souris mutantes KO et mKO corrige rapidement la perte de mobilité et de force globale jusqu'à, respectivement 6 et 12 mois(Annexe 2, tableau 1).

Les muscles mutants KO et mKO, du panel représentatif, accusent une perte de poids importante causée par une réduction de la taille des fibres musculaires à respectivement 15 jours et 1,5 mois après le début de l'expérience. La présence de la protéine transgénique dans le muscle mutant KO et mKO, corrige la perte de masse musculaire rapidement et jusqu'à, respectivement 6 et 12 mois (Annexe 2, tableau 1).

Les effets de la protéine transgénique sur l'histologie du muscle mutant sont étudiés sur le TA avec les mêmes colorations histologiques décrites précédemment. La détection de la dysferline et DHPR1α va permettre de renforcer l'étude de la désorganisation des fibres musculaires. Dans les muscles normaux, le marquage de la dysferline montre que la protéine est très fortement présente à la membrane plasmique et plus faiblement dans la fibre musculaire. Le marquage du DHPR1α, dans ce même muscle, montre que la protéine est répartie sous forme de filet dans la fibre musculaire. La présence de la protéine transgénique dans le muscle TA KO et mKO corrige l'ensemble de l'histologie rapidement et jusqu'à, respectivement, 6 et 12 mois. Le marquage de la dysferline et DHPR1α dans le TA KO est corrigé par la protéine transgénique dès 15 jours après l'injection du vecteur et jusqu'à 6 mois. Dans le TA mKO, 12 mois après l'injection du vecteur, le marquage de la dysferline et DHPR1α est corrigé (Annexe 2, tableau 1).

L'étude de la force musculaire individuelle est réalisée sur l'EDL, comme décrit précédemment. La présence de la protéine dans l'EDL mutant KO 15 jours après l'injection du vecteur corrige partiellement la force du muscle. Six mois après l'injection du vecteur, la force de l'EDL mutant KO et complètement corrigé. La présence de la protéine dans l'EDL mKO corrige complètement la force 12 mois après l'injection du vecteur (Annexe 2, tableau 1).

En conclusion, l'ensemble des résultats démontre que le vecteur AAV9-DES-MTM1 permet d'apporter la protéine thérapeutique dans l'ensemble des muscles de l'organisme malade. La

présence de la protéine dans le muscle corrige rapidement l'ensemble de la pathologie musculaire. L'effet thérapeutique est stable jusqu'à un an après une seule injection. La correction du phénotype musculaire rallonge la survie et restaure le développement des souris malades.

	Modèle KO		Modèle mKO	
Dose de vecteur (vg.kg^{-1})	$3x10^{13}$		$0,5x10^{13}$	
Taux de survie	Identique au contrôle		Identique au contrôle	
Développement	Identique au contrôle		Identique au contrôle	
Analyses	**15 jours**	**6 mois**	**6 semaines**	**1 an**
Force globale	Proche du contrôle	Identique au contrôle	Identique au contrôle	Identique au contrôle
Quantité de protéine dans le muscle	10 fois supérieure au niveau physiologique		Niveau physiologique	
Poids du muscle	Proche du poids normal	Proche du poids normal	Proche du poids normal	Proche du poids normal
Histologie	Identique au contrôle	Identique au contrôle	Identique au contrôle	Identique au contrôle
Marquage DHPR1α	Identique au contrôle	Identique au contrôle	Identique au contrôle	Identique au contrôle
Marquage dysferline	Identique au contrôle	Identique au contrôle	Identique au contrôle	Identique au contrôle
Force musculaire de l'EDL	½ de la force contrôle	Identique au contrôle	Identique au contrôle	Identique au contrôle

Tableau 1 : Récapitulatif des résultats des analyses de caractérisation des effets du vecteur AAV9-DES-MTM1 sur les modèles KO et mKO.

Récapitulatif des résultats obtenus dans la publication « *Gene replacement therapy for myotubularin deficiency prolongs survival and restores muscle function in murine and canine models of X-linked myotubular myopathy* » (Annexe 2 ; soumis à la publication dans (Science Translational Medicin)).

3.1.4 Spécificité tissulaire du vecteur AAV9-DES-MTM1

Le choix d'utiliser le promoteur desmine a été motivé par le soucis d'améliorer le contrôle de l'expression du transgène au niveau du muscle squelettique. La vérification de cette hypothèse passe par la quantification du niveau de la protéine transgénique dans différents organes provenant des souris mutantes KO injectées avec le vecteur AAV9-DES-MTM1, décrites précédemment. Une rapide analyse histologique des différents organes étudiés permet de détecter d'éventuelles lésions.

Le cœur.

Le niveau de protéines thérapeutiques dans le cœur mutant, 15 jours et 6 mois après l'injection intraveineuse du vecteur, est, respectivement, 67 et 200 fois plus important que le niveau endogène de myotubularine (Figure 16A). La quantité de protéines thérapeutiques est plus importante dans le muscle cardiaque que dans le muscle squelettique.

Le poids des cœurs de souris mutantes, 15 jours et 6 mois après l'injection du vecteur, ne change pas par rapport au poids des cœurs normaux (Figure 16B).

Les colorations histologiques HE et NADH-TR du muscle cardiaque mutant contenant le transgène, deux semaines après l'injection du vecteur, montrent que la structure interne des myofibres cardiaques est identique à celles du muscle normal (Figure 16C). La coloration rouge Sirius sur des coupes de cœurs normaux, six mois après l'injection du vecteur chez le mutant, met en évidence la présence de plusieurs petites plaques de collagène dans l'un des cinq cœurs. La même coloration dans le cœur des souris mutantes, six mois après l'injection du vecteur, montre la présence de petites plaques de collagène dans deux des cinq muscles mutants contenant le transgène. Les trois autres contiennent une grosse plaque de collagène (Figure 16D).

La protéine transgénique est présente en quantité très importante dans le cœur, de façon rapide et jusqu'à 6 mois. La présence d'une aggravation du phénomène de plaques de collagène, dans le cœur mutant contenant la protéine thérapeutique, semble indiquer que la protéine a un effet sur l'histologie du cœur.

Les autres organes.

La quantité de protéines transgéniques présentes dans le foie, le poumon, la rate, les testicules, le rein et le cerveau est déterminée par Western Blot 6 mois après l'injection du vecteur AAV9-DES-MTM1 chez le mutant KO (Figure 17A). La quantité moyenne de protéines dans le poumon est équivalente au niveau endogène de myotubularine. Dans le foie des souris mutantes traitées avec le vecteur, la quantité de protéines transgéniques est inférieure de moitié à la quantité physiologique de myotubularine. La rate, des souris mutantes traitées avec le vecteur, contient un faible taux de protéine transgénique. Les testicules, le rein et le cerveau provenant des souris mutantes KO traitées avec le vecteur ne contiennent pas de protéines transgéniques (Figure 17A).

L'analyse histologique des organes est réalisée sur des coupes transversales colorées à l'hématoxiline-éosine. Le foie, le poumon, la rate, le rein et le cerveau des souris mutantes traitées avec le vecteur ne présentent pas de différences histologiques avec les organes normaux (Figure 17D, 17E, 17F, 17G, 17B). En revanche, l'histologie des testicules provenant de souris mutantes injectées avec le vecteur, montre que deux testicules, sur les cinq analysés, possèdent des tubes séminifères contenant, une couronne cellulaire à sa base et un lumen rempli de spermatides, comme dans tous les testicules contrôles. Un autre testicule mutant, sur les cinq, présente des tubes séminifères avec des vacuoles au niveau de la lame basale et un lumen sur deux dépourvu de spermatides. Un autre testicule mutant sur les cinq ne contient que des tubes séminifères dépourvus de spermatides. Enfin, dans le dernier testicule, les tubes séminifères sont dépourvus de cellules et de spermatides (Figure 17C).

En conclusion, les résultats démontrent que le vecteur AAV9-DES-MTM1 possède une spécificité plus importante pour le muscle cardiaque que pour le muscle squelettique. Dans le cœur, il semblerait que la quantité de protéine transgénique soit impliquée dans l'apparition des plaques de collagène. Les niveaux de protéine transgénique dans les autres organes ne dépassent pas le niveau physiologique de myotubularine. L'absence de myotubularine semble être responsable d'anomalies histologiques dans les testicules. Le promoteur de la desmine semble augmenter la spécificité du vecteur pour le muscle.

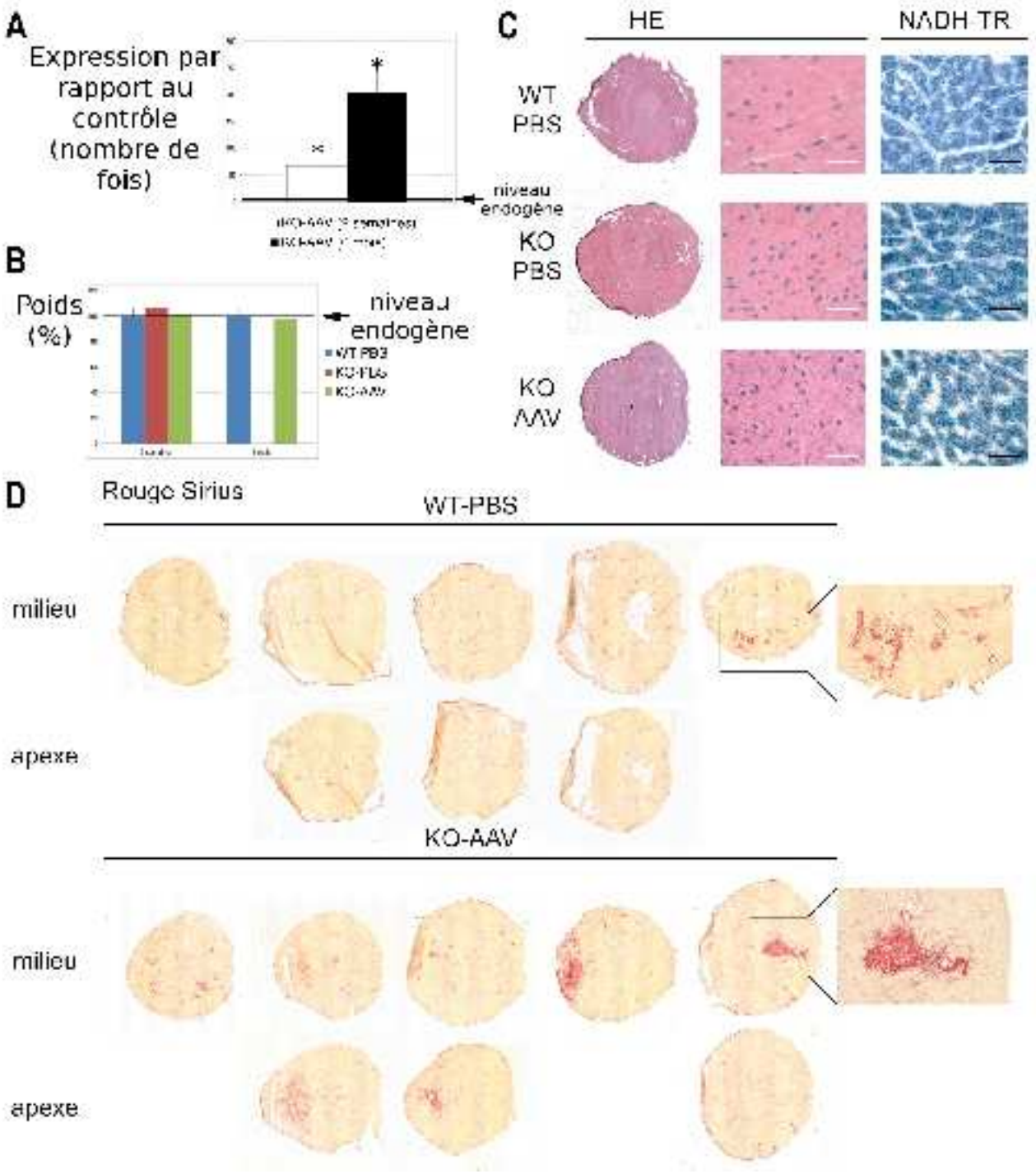

A
Expression par rapport au contrôle (nombre de fois)
niveau endogène
B
Poids (%)
niveau endogène
C
HE
NADH TR
WT PBS
KO PBS
KO AAV
D
Rouge Sirius
WT-PBS
milieu
apexe
KO-AAV
milieu
apexe

Figure 16 : Analyse du cœur des souris mutantes 6 mois après l'injection intraveineuse du vecteur thérapeutique AAV9-DES-MTM1.

A/ Quantité de myotubularine normalisée par la quantité de GAPDH et représentée en fonction du muscle contrôle (2 semaines : WT-PBS = 8 ; KO-PBS = 4 ; KO-MTM1 = 5 ; 6 mois : WT-PBS = 10 ; KO-MTM1 = 9) ; (* = P < 0,05). B/ Poids des cœurs exprimé en pourcentage du poids du muscle contrôle 2 semaines et 6 mois après l'injection du vecteur. (2 semaines : WT-PBS = 8 ; KO-PBS = 4 ; KO-MTM1 = 5 ; 6 mois : WT-PBS = 10 ; KO-MTM1 = 9). C/ Histologie du muscle cardiaque 2 semaines après l'injection du vecteur chez le mutant KO. De gauche à droite : macroscopies de coupes transversales de cœur colorées à l'hématoxyline-éosine ; Agrandissements des coupes transversales de cœur colorées à l'hématoxyline-éosine ; Agrandissements de coupes transversales de cœur colorées au NADH-TR. Échelle = 25 µm. D/ Histologie du muscle mutant 6 mois après l'injection du vecteur. Images du haut : macroscopies de coupes transversales de muscle cardiaque contrôle, colorées au rouge Sirius. A droite : agrandissement de la zone contenant des plaques de collagène (WT-PBS = 5 ; KO-MTM1 = 5). Image du bas : macroscopies des coupes transversales de muscle cardiaque mutant injecté avec le vecteur, colorées au rouge Sirius. A droite : agrandissement de la zone contenant des plaques de collagène (WT-PBS = 5 ; KO-MTM1 = 5).

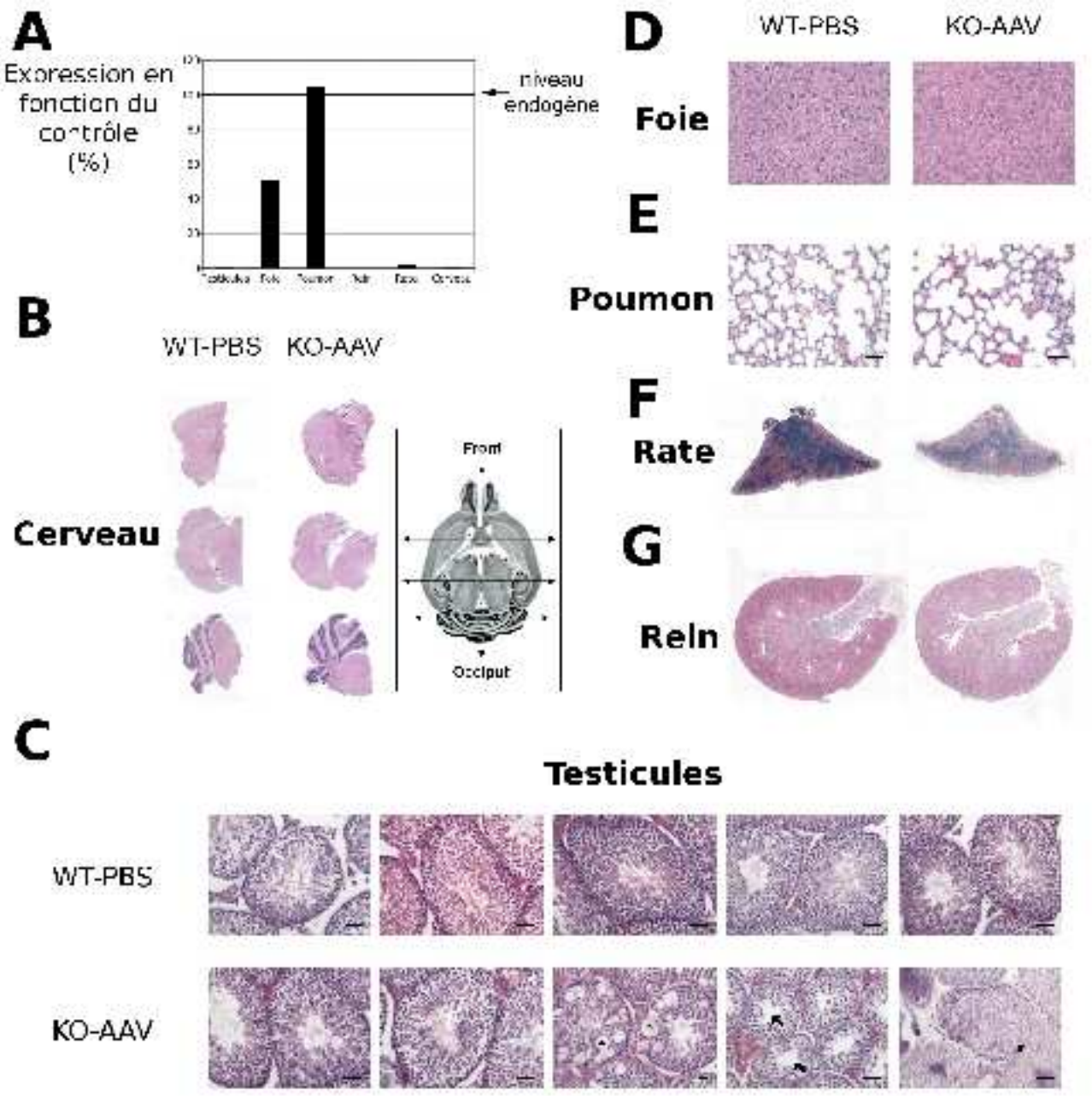

A
Expression en fonction du contrôle (%)
niveau endogène
B
WT-PBS
KO-AAV
Cerveau
Front
Occiput
C
Testicules
WT-PBS
KO-AAV
D
WT-PBS
KO-AAV
Foie
E
Poumon
F
Rate
G
Rein

Figure 17 : Niveau de myotubularine et histologie de plusieurs organes vitaux chez la souris KO 6 mois après l'injection du vecteur thérapeutique AAV9-DES-MTM1.

A/ Quantité de myotubularine normalisée **par la quantité d'α-tubuline et représenté en p**ourcentage du niveau de myotubularine de l'organe contrôle. Effectifs des testicules et du rein : WT-PBS = 10 ; KO-AAV = 10. Effectifs du foie, du poumon, de la rate et du cerveau : WT-PBS = 5 ; KO-AAV = 5. **B/** Histologie générale du cerveau et orientation des coupes (WT-PBS = 5 ; KO-MTM1 = 5). **C/** Histologie de coupe transversale de testicules colorée à l'hématoxyline-éosine. Etoile : vacuoles . Flèche : disparition des spermatides. tête de flèche : nécrose complète. (WT-PBS = 10 ; KO-MTM1 = 10). Echelle = 50 µm. **D/** Histologie de coupes de foie colorées à l'hématoxyline-éosine (WT-PBS = 5 ; KO-MTM1 = 5). Echelle = 50 µm. **E/** Histologie de coupes de poumon colorées à l'hématoxyline-éosine (WT-PBS = 5 ; KO-MTM1 = 5). Echelle = 50 µm. **F/** Histologie de coupes transversales de rate colorées à l'hématoxyline-éosine (WT-PBS = 5 ; KO-MTM1 = 5). **G/** Histologie de coupes transversales de rein colorées à l'hématoxyline-éosine (WT-PBS = 5 ; KO-MTM1 = 5).

3.2 Étude sur l'efficacité thérapeutique de MTMR2 chez les souris déficientes en myotubularine

La deuxième partie de ma thèse est dédiée à la recherche de transgène alternatif à MTM1 pour soigner la myopathie myotubulaire, en raison d'une hypothétique réponse immunitaire observée lors de la première étape de développement du traitement de la myopathie myotubulaire par la thérapie génique. Notre choix s'est arrêté sur le transgène MTMR2 et pour évaluer sa capacité thérapeutique sur le phénotype musculaire de la myopathie myotubulaire, le transgène est inséré dans une cassette thérapeutique contenant le promoteur desmine, utilisé précédemment. La cassette thérapeutique est encapsidée dans le sérotype 1 des AAV. La fonctionnalité et les effets du vecteur AAV1-DES-MTMR2 sont étudiés sur le muscle du mutant KO.

3.2.1 Effets du vecteur AAV1-DES-MTMR2 sur le muscle du modèle murin KO

La capacité thérapeutique du vecteur AAV1-DES-MTMR2 est évaluée après injection intramusculaire d'une dose de maximale de $3,6x10^{9}$ vg ($1,7x10^{14}$ vg.kg^{-1}) dans le muscle tibialis antérieur (TA) et de $1,3x10^{9}$ vg ($1,7x10^{14}$ vg.kg^{-1}) dans le muscle extensor digitorum longus (EDL) de souris KO âgées de 3 semaines. L'expression du transgène est évalué par quantification du niveau de la protéine transgénique dans le TA. Les effets du vecteur sur le muscle mutant sont caractérisés 2 semaines après l'injection du vecteur grâce aux mêmes tests morphologiques, histologiques et fonctionnels réalisés dans le chapitre précédent.

La quantité de protéine MTMR2 dans le muscle normal (WT-PBS) ou mutant (KO-PBS), déterminée par Western blot, est indétectable dans ces conditions expérimentales (Figure 18B). En revanche, 2 semaines après l'injection du vecteur AAV1-DES-MTMR2 dans le muscle mutant (KO-MTMR2) ou normal (WT-MTMR2), la quantité de protéine MTMR2 est en moyenne de, respectivement, 0,063 +/- 0,024 UA (unité arbitraire) et 0,17 +/- 0,045 UA. La quantité de protéine MTMR2 diminue d'environ 2,5 fois entre le muscle normal (WT-MTMR2) et le muscle mutant (KO-MTMR2) (Figure 18A).

Ces résultats démontrent que le vecteur AAV1-DES-MTMR2 est fonctionnel.

Les effets de la protéine thérapeutique MTMR2 sont analysés au niveau du poids et de la répartition des myofibres des muscles TA et EDL. Tout comme le poids des TA mutants KO décrits précédemment, le poids des EDL mutants KO est réduit par rapport au poids du muscle normal et la perte de masse musculaire touche l'ensemble des myofibres (Figure 18D, 18E). La présence de la protéine transgénique dans le TA ou l'EDL mutant KO, 2 semaines après l'injection du vecteur, ne modifie pas le poids du muscle (Figure 18G et 18D). En revanche, la taille d'une petite partie des myofibres du TA et de l'EDL mutant KO, traitées avec le vecteur, est augmentée (Figure 18H et 18ED).

Les effets de la protéine thérapeutique MTMR2 sont ensuite analysés au niveau de l'histologie, comme dans le chapitre précédent, du TA et de l'EDL, 2 semaines après l'injection du vecteur. L'histologie du muscle mutant KO EDL montre, comme dans le TA mutant KO, des fibres musculaires dont la structure interne est désorganisée par rapport à celle du muscle normal (Figure 18C). Les muscles TA et EDL normaux, contenant MTMR2, ont des fibres musculaires dont la structure interne est identique à celle des muscles normaux non traités (Figure 18C). Les muscles TA et EDL mutants, contenant MTMR2, ont des myofibres dont la structure interne est identique à celle des muscles mutants non traités (Figure 18C).

Enfin, les effets de la protéine thérapeutique MTMR2 sont analysés au niveau de la force isolée du muscle EDL. L'EDL normal contenant MTMR2 présente une force musculaire deux fois plus importante que le muscle normal. L'EDL mutant contenant la protéine thérapeutique MTMR2 possède une force plus élevée que le muscle mutant contrôle, soit environ 65% de la force du muscle contrôle (Figure 18F).

En conclusion, les résultats montrent que le vecteur AAV1-DES-MTMR2 est fonctionnel. La protéine MTMR2 ne semble agir que sur une partie du phénotype musculaire de la maladie. MTMR2 ne semble remplacer la myotubularine que pour une partie des fonctions qu'elle remplit dans le muscle. Il reste à déterminer si l'effet thérapeutique d'MTMR2 est lié à sa concentration intramusculaire.

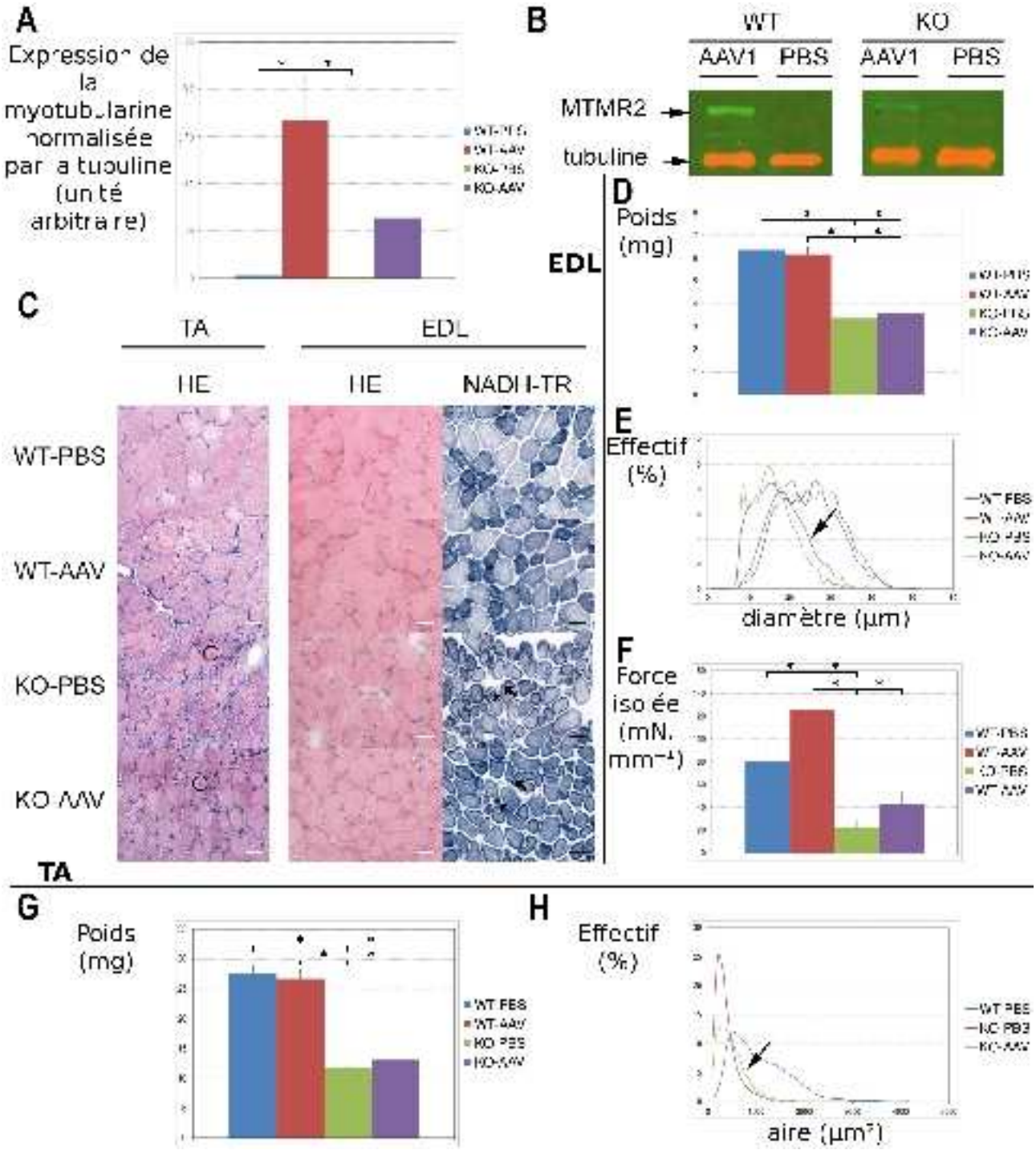

A
Expression de la myotubularine normalisée par la tubuline (unité arbitraire)
B
WT
KO
AAV1
PBS
AAV1
PBS
MTMR2
tubuline
C
TA
EDL
HE
HE
NADH-TR
WT-PBS
WT-AAV
KO-PBS
KO-AAV
TA
EDL
D
Poids (mg)
E
Effectif (%)
diamètre (µm)
F
Force isolée (mN.mm⁻¹)
G
Poids (mg)
H
Effectif (%)
aire (µm²)

Figure 18 : Effets du vecteur AAV1-DES-MTMR2 15 jours après l'administration intramusculaire dans le tibialis antérieur et l'EDL du mutant KO.

A/ Quantité de protéines MTMR2 normalisée par l'α-tubuline dans le TA (WT-PBS = 8 ; WT-AAV = 8 ; KO-PBS = 6 ; KO-AAV = 6) ; (* = P < 0,05). **B/** Western Blot de quantification du niveau d'MTMR2 dans le TA. **C/** Histologie des muscles TA et EDL. *Images de gauche* : coupes transversales de TA colorées à l'hématoxyline-éosine non différenciée. Cercle : noyaux internalisés. Etoile : vacuoles. *Images du milieu* : coupes transversales d'EDL colorées au NADH-TR. Flèche : regroupement des mitochondries au niveau de la membrane plasmique ; tête de flèche : regroupement des mitochondries au centre de la myofibre. (WT-PBS = 8 ; WT-AAV = 8 ; KO-PBS = 6 ; KO-AAV = 6). Les barres d'échelle représentent 25 µm. **D/** Poids des EDLs (WT-PBS = 12 ; WT-AAV = 12 ; KO-PBS = 6 ; KO-AAV = 7) ; (* = P < 0,05). **E/** Profil de répartition des myofibres en fonction de leur taille dans l'EDL. Flèche : augmentation des fibres dans la portion de diamètre 30 à 40 µm (WT-PBS = 3488 ; WT-AAV = 3840 ; KO-PBS = 2582 ; KO-AAV = 2995). **F/** Force isolée du muscle EDL (WT-PBS = 6 ; WT-AAV = 4 ; mKO-PBS = 4 ; mKO-AAV = 2) ; (* = P < 0,05). **G/** Le poids des TA (WT-PBS = 9 ; WT-AAV = 9 ; mKO-PBS = 6 ; mKO-AAV = 9) ; (* = P < 0,05). **H/** Profil de répartition des myofibres en fonction de leur taille dans le TA. Flèche : augmentation du nombre de fibres dans la portion de 700 et 1500 μm^2 (WT-PBS = 8597 ; KO-PBS = 11387 ; KO-AAV = 6308).

3.2.2 Stratégie pour augmenter la quantité de protéine MTMR2 dans le muscle des souris déficientes en myotubularine

Afin de démontrer que la capacité thérapeutique d'MTMR2 sur le phénotype musculaire de la myopathie myotubulaire est lié à la quantité de protéine présente dans le muscle, le vecteur AAV9-DES-MTMR2 est créé. Le choix du sérotype 9 des AAV a été motivé par des problèmes de concentration lors de la production du vecteur AAV1-DES-MTMR2. Les effets du vecteur AAV9-DES-MTMR2 sont analysés 2 semaines après injection intramusculaire d'une dose de $2,7x10^{10}$ vg ($1,9x10^{15}$ $vg.kg^{-1}$) dans le TA et $9,3x10^{9}$ vg dans l'EDL, chez le modèle KO âgé de 3 semaines.

La première étape, dans le processus d'analyse des effets du vecteur AAV9-DES-MTMR2 sur le muscle mutant KO, est de déterminer la quantité de protéine thérapeutique MTRM2 présente dans les muscles TA. Ensuite, les effets de la protéine MTMR2 sur le muscle sont analysés avec les mêmes expériences que pour le vecteur AAV1-DES-MTMR2.

La quantité endogène de protéines MTMR2 est indétectable dans les muscles mutants (KO-PBS) et normaux (WT-PBS) non traités avec le vecteur, dans ces conditions expérimentales. La quantité de protéine thérapeutique MTMR2 dans le muscle contrôle (WT-MTMR2) est de 1,78 +/- 0,28 UA et dans le muscle mutant contrôle (KO-MTMR2) de 0,025 +/- 0,01 UA, soit environ 70 fois moins (Figure 19A et 19B).

Le poids du TA et de l'EDL mutant KO ou normal, traités avec le vecteur, est identique à celui des muscles mutants KO et normaux non traités (Figure 19D et 19E). Le profil de répartition des myofibres de l'EDL mutant KO ou normal, traité avec le vecteur, est identique à celui des EDL mutants KO et normaux non traités (Figure 19F).

L'histologie du TA mutant KO ou normal, contenant la protéine MTMR2, est identique à, respectivement, l'histologie du TA mutant KO contrôle et du TA normal (Figure 19C).

La force de l'EDL mutant KO ou normal, traités avec le vecteur, est identique à celle des muscles mutants KO ou normaux non traités (Figure 19G).

En conclusion, ces résultats montrent que malgré un vecteur fonctionnel, la protéine MTMR2 n'a pas d'effet sur le muscle mutant ou sur le muscle normal. La réalisation des expériences avec le vecteur AAV1-DES-MTMR2 et le vecteur AAV9-DES-MTMR2 de façon indépendante, ne permet pas de comparer les quantités des protéines présentes dans les différents

types de muscles. Cependant, la diminution de protéine MTMR2 observée entre le muscle normal et mutant, après injection de l'un ou l'autre vecteur, semble plus importante dans le cas du vecteur AAV9-DES-MTMR2.

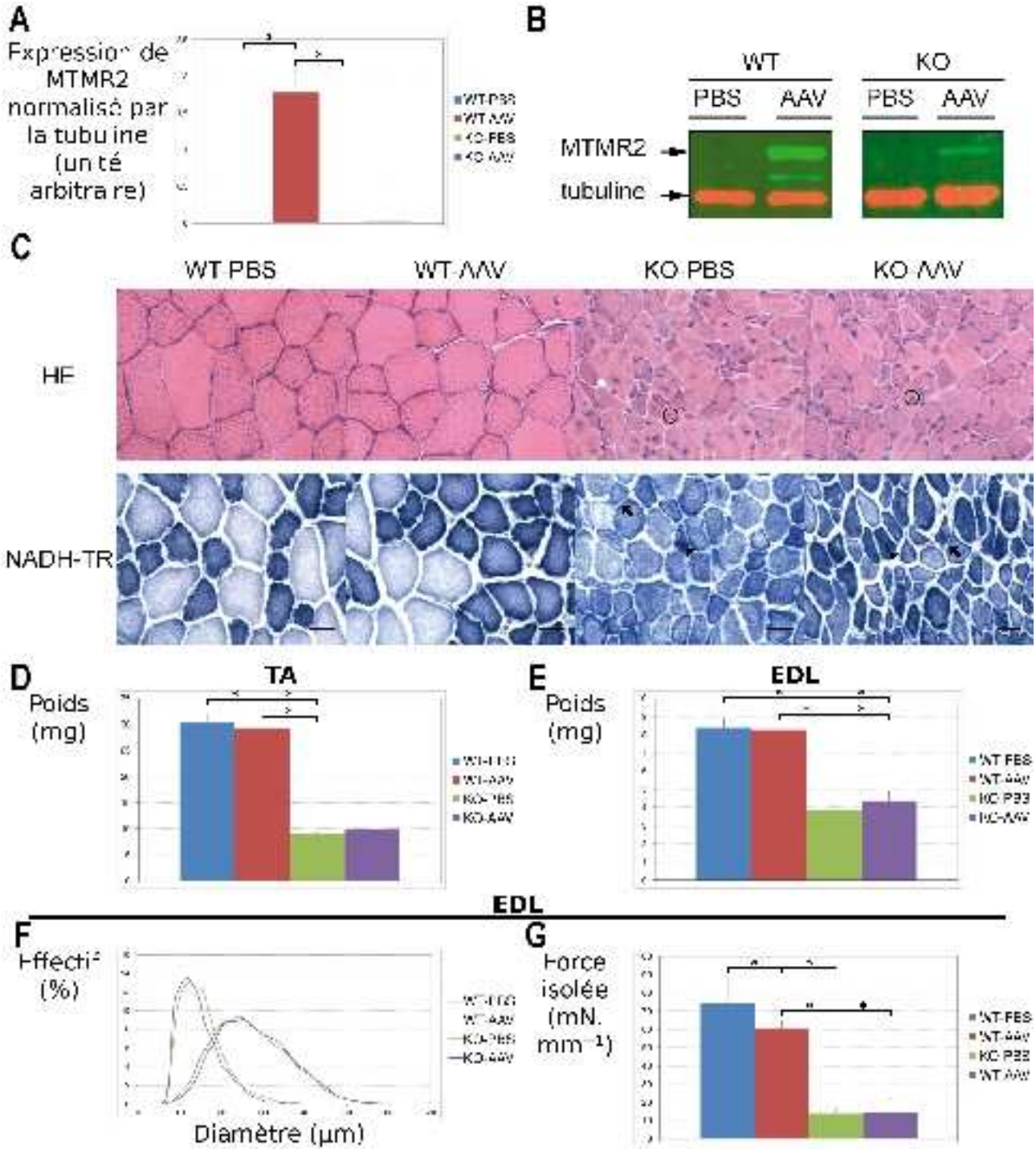

A
Expression de MTMR2 normalisé par la tubuline (unité arbitraire)
B
WT
KO
PBS
AAV
PBS
AAV
MTMR2
tubuline
C
WT PBS
WT AAV
KO PBS
KO AAV
HE
NADH-TR
D
TA
Poids (mg)
E
EDL
Poids (mg)
EDL
F
Effectif (%)
Diamètre (µm)
G
Force isolée (mN. mm⁻¹)

Figure 19 : Effets du vecteur AAV9-DES-MTMR2 sur le tibialis antérieur et EDL mutant KO 15 jours après l'injection intramusculaire.

A/ Quantité de myotubularine dans le TA normalisée par la quantité d'α-tubuline (WT-PBS = 6 ; WT-AAV = 6 ; KO-PBS = 7 ; KO-AAV = 7). **B/** Western Blot de quantification d'MTMR2 dans le TA (WT-PBS = 6 ; WT-AAV = 6 ; KO-PBS = 7 ; KO-AAV = 7) ; (* = P < 0,05). **C/** Histologie du muscle TA. *Images du haut* : coupes transversales colorées à l'hématoxyline-éosine. Cercle : noyau internalisé (WT-PBS = 6 ; WT-AAV = 6 ; KO-PBS = 7 ; KO-AAV = 7). *Images du bas* : coupes transversales colorées au NADH-TR. Flèche : regroupement des mitochondries à la membrane plasmique. Tête de flèche : regroupement des mitochondries au centre de la myofibre. (WT-PBS = 6 ; WT-AAV = 6 ; KO-PBS = 7 ; KO-AAV = 7). Les barres d'échelle représentent 25 µm. **D/** Poids des muscles TA (WT-PBS = 6 ; WT-AAV = 6 ; KO-PBS = 5 ; KO-AAV = 5) ; (* = P < 0,05). **E/** Poids de l'EDL (WT-PBS = 9 ; WT-AAV = 9 ; KO-PBS = 8 ; KO-AAV = 7) ; (* = P < 0,05). **F/** Profil de répartition des myofibres en fonction de leur taille dans l'EDL (WT-PBS = 14952 ; WT-AAV = 13666 ; KO-PBS = 13348 ; KO-AAV = 11997). **G/** Force isolée de l'EDL (WT-PBS = 9 ; WT-AAV = 7 ; mKO-PBS = 6 ; mKO-AAV = 7) ; (* = P < 0,05).

3.3 Rôle de l'activité phosphatase de la myotubularine dans l'action thérapeutique

La troisième partie de ma thèse consiste à étudier le rôle de l'activité phosphatase de la myotubularine dans l'action thérapeutique sur la myopathie myotubulaire. L'hypothèse est que l'activité phosphatase de la myotubularine remplit un rôle essentiel dans l'activité thérapeutique de la protéine. Cette hypothèse est démontrée en comparant les effets d'une myotubularine catalytiquement inactive (transgène MTM1cs) sur le phénotype musculaire de la myopathie myotubulaire, avec les effets de la myotubularine active (transgène MTM1) sur ces mêmes muscles. La myotubularine inactive (MTM1c375s ou MTM1cs) est obtenue par remplacement la cystéine 375 du site catalytique par une sérine. L'étude des effets des deux transgènes MTM1cs et MTM1 sur le muscle malade passe par la création de deux vecteurs, respectivement, AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1.

La première étape de cette étude passe par la vérification de la fonctionnalité des deux vecteurs. Ensuite les effets des deux protéines sur le muscle sont évalués au niveau de la masse musculaire et de l'organisation interne de la fibre musculaire comme dans les chapitres précédents. Les expériences sont faites dans le modèle murin KO et mKO pour renforcer les résultats.

3.3.1 Effets de la myotubularine inactive dans le muscle du modèle murin de la myopathie myotubulaire

L'étude des effets de la myotubularine active (MTM1 ou MTM1wt) et inactive (MTM1cs) sur le muscle mutant KO et mKO est réalisée par l'injection intramusculaire des vecteurs AAV1-CMV-MTM1 et AAV1-CMV-MTM1c375s, à une dose équivalente d'environ $8x10^{14}$ $vg.kg^{-1}$ dans le tibialis antérieur (TA) mutant mKO et KO de souris âgées, respectivement de 4 et 3 semaines.

La première étape est de vérifier l'expression des transgène en mesurant la quantité des différentes protéines transgéniques dans les muscles. Ensuite, l'effet de ces protéines est analysé sur le muscle mutant mKO et KO.

Vérification de l'expression des transgènes dans le muscle mutant mKO et KO.

La présence des différentes protéines transgéniques MTM1wt et MTM1cs, dans les muscles traités avec le vecteur AAV1-CMV-MTM1 ou AAV1-CMV-MTM1c375s, est réalisée par western blot après 2 et 4 semaines chez, respectivement, le mutant KO et mKO.

Le niveau de la protéine transgénique MTM1wt dans le TA normal (WT-MTM1wt) ou mutant mKO (mKO-MTM1wt), traité avec le vecteur AAV1-CMV-MTM1, est de, respectivement, 1000 fois et 350 fois plus que la quantité endogène de myotubularine. Le niveau de la protéine transgénique MTM1cs dans le muscle contrôle (WT-MTM1cs) ou mutant mKO (mKO-MTM1cs), traités avec le vecteur AAV1-CMV-MTM1cs, est, respectivement, de 440 fois et de 100 fois plus que la quantité physiologique de myotubularine (Figure 20A et 20B).

Le niveau de la protéine transgénique MTM1wt dans le TA normal (WT-MTM1wt) ou mutant KO, traités avec le vecteur AAV1-CMV-MTM1, est de, respectivement, 4 fois et 2,5 fois plus que le niveau endogène de myotubularine. Le niveau de la protéine MTM1cs dans le TA normal (WT-MTM1cs) traité avec le vecteur AAV1-CMV-MTM1cs, est 4 fois plus important que le niveau endogène de myotubularine, tandis que le même traitement dans le TA mutant KO (KO-MTM1cs) donne un niveau de la protéine MTM1cs équivalent au niveau endogène de myotubularine (Figure 21A et 21B).

En conclusion, ces résultats démontrent que les vecteurs AAV1-CMV-MTM1wt et AAV1-CMV-MTM1cs sont fonctionnels et permettent d'avoir des niveaux protéiques pour MTM1wt et MTM1cs équivalents dans un même type de muscle.

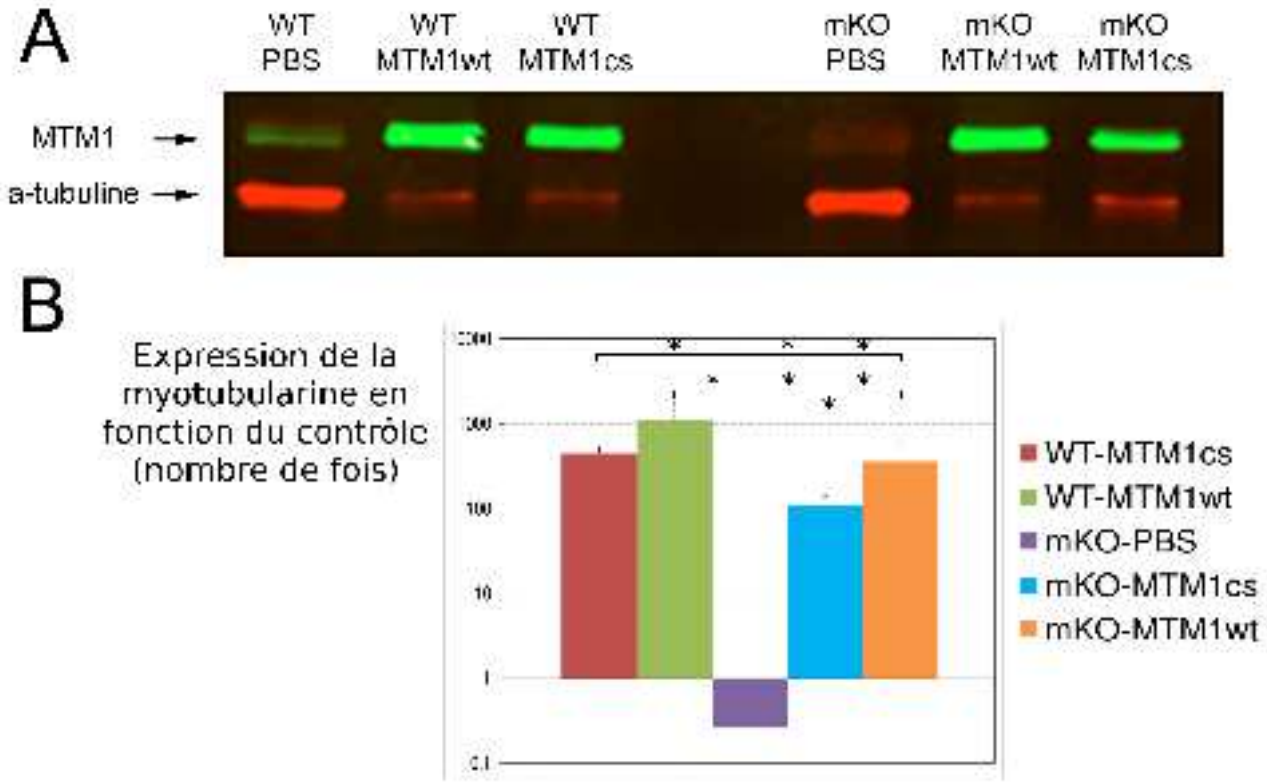


Figure 20 : Quantification de la myotubularine dans le muscle tibialis antérieur mKO de souris 4 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt.

A/ Western blot représentatif de l'immunodétection de la myotubularine (en vert) et de l'α-tubuline (en rouge). **B/** Quantité de myotubularine, dans les TA, normalisée par la quantité d'α-tubuline (WT-PBS : n = 2 ; mKO-PBS : n = 3 ; WT-MTM1cs : n = 5 ; WT-MTM1wt : n = 5 ; mKO-MTM1cs : n = 5 ; mKO-MTM1wt : n = 2) ; (* = P < 0,05). WT-PBS = contrôle positif ; mKO-PBS = mutant contrôle ; WT-MTM1cs = contrôle injecté avec la myotubularine inactive ; WT-MTM1wt = contrôle injecté avec la myotubularine active ; mKO-MTM1cs = mutant injecté avec la myotubularine inactive ; mKO-MTM1wt = mutant injecté avec la myotubularine active. MTM1 = myotubularine ; PBS : Dulbecco's phosphate buffered saline ; WT = souris contrôle positif ou sauvage ; mKO = souris mutante muscle spécifique.

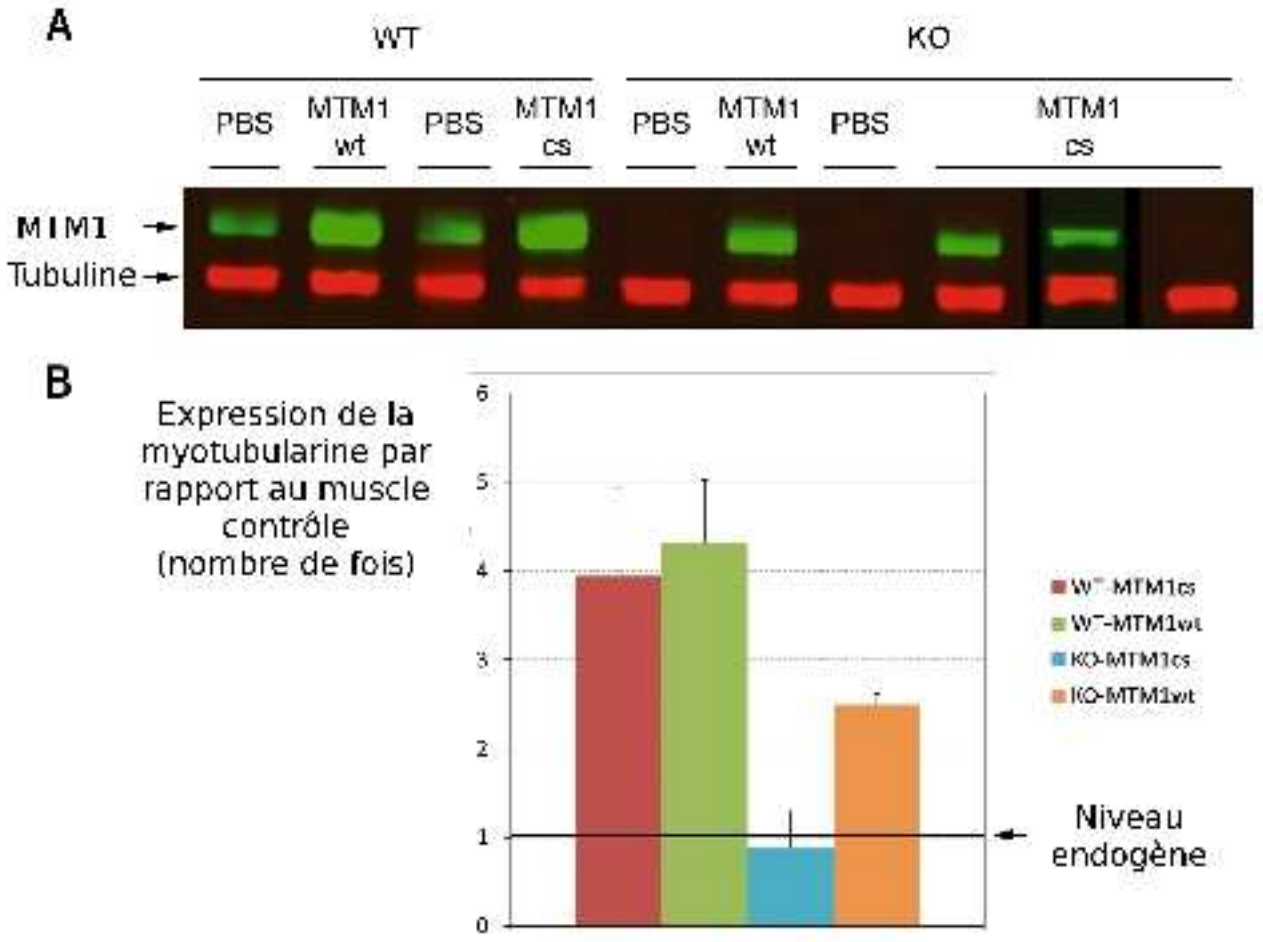


Figure 21 : Quantification de la myotubularine dans les muscles tibialis antérieurs KO 2 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt.

A/ Western blot représentatif de l'immunodétection de la myotubularine (vert) et de l'α-tubuline (rouge) dans le tibialis antérieur (TA). **B/** Quantification de la myotubularine normalisée par la quantité d' α-tubuline dans le TA (WT-PBS : n = 8 ; mKO-PBS : n = 5 ; WT-MTM1cs : n = 4 ; WT-MTM1wt : n = 4 ; mKO-MTM1cs : n = 3 ; mKO-MTM1wt : n = 2) ; (* = P < 0,05).

Effets de la myotubularine active ou inactive sur la morphologie du muscle mutant mKO et KO.

Les effets des deux protéines MTM1cs et MTM1wt sur la morphologie du muscle TA mutant mKO et KO sont analysés au niveau de la masse musculaire et de l'histologie à, respectivement, 4 et 2 semaines après injection intramusculaire du vecteur. L'effet des deux protéines sur le muscle TA mutant mKO est également étudié au niveau des trois marqueurs : RYR1, DHPR1α, et dysferline qui servent de marqueurs de l'organisation interne de la fibre musculaire.

Le poids du TA normal contenant MTM1cs ou MTM1wt accuse une réduction de, respectivement 15 % et 20% par rapport au muscle normal (WT-PBS). Le poids du TA mutant mKO ne change pas lorsque la myotubularine inactive est présente dans le muscle, tandis qu'il est partiellement corrigé lorsqu'il contient la myotubularine active. Le diamètre moyen et le profil de répartition des myofibres des muscles normaux contenant MTM1cs ou MTM1wt sont similaires à ceux du muscle normal. Le diamètre moyen des myofibres du TA mKO contenant MTM1cs est similaire à celui du TA mutant contrôle. Le profil de répartition des myofibres du TA mKO, contenant MTM1cs, montre une augmentation de la taille d'une petite proportion de myofibres. La présence de la protéine MTM1wt dans le TA mutant mKO corrige partiellement le diamètre moyen des myofibres en agissant sur une grosse partie des fibres musculaires (Figure 22B, 22C et 22D).

Le poids des muscles contrôles contenant MTM1wt ou MTM1cs est identique à celui du muscle normal. La protéine MTM1cs ne corrige pas le poids du TA mutant KO contrairement à la protéine MTM1wt qui corrige partiellement le poids. La normalisation du poids du muscle traité par rapport à son contrôle latéral montre que la protéine MTM1cs provoque une augmentation du poids de 1,2 fois. Le même rapport avec le poids du TA KO contenant MTM1wt montre uen augmentation du poids d 1,3 fois (Figure 23B et 23C).

Ces résultats démontrent que la myotubularine inactive ne corrige pas la masse musculaire du TA malade, contrairement à la myotubularine active qui corrige la perte de masse musculaire.

L'histologie, déterminée grâce aux colorations HE et NADH-TR décrites précédemment, du TA mutant mKO contenant MTM1cs est identique à celle du TA mutant mKO contrôle. En revanche l'histologie du TA mKO contenant MTM1wt est identique à celle du TA normal (Figure 22A).

L'histologie du TA mutant KO contenant MTM1cs est identique à celle du TA mutant KO, contrairement au TA KO contenant MTM1wt qui présente une histologie identique à celle du

muscle normal (Figure 23A).

Les résultats de l'histologie démontrent que la myotubularine inactive ne corrige pas la désorganisation des fibres musculaires malades, contrairement à la myotubularine active qui elle restaure une fibre musculaire normale.

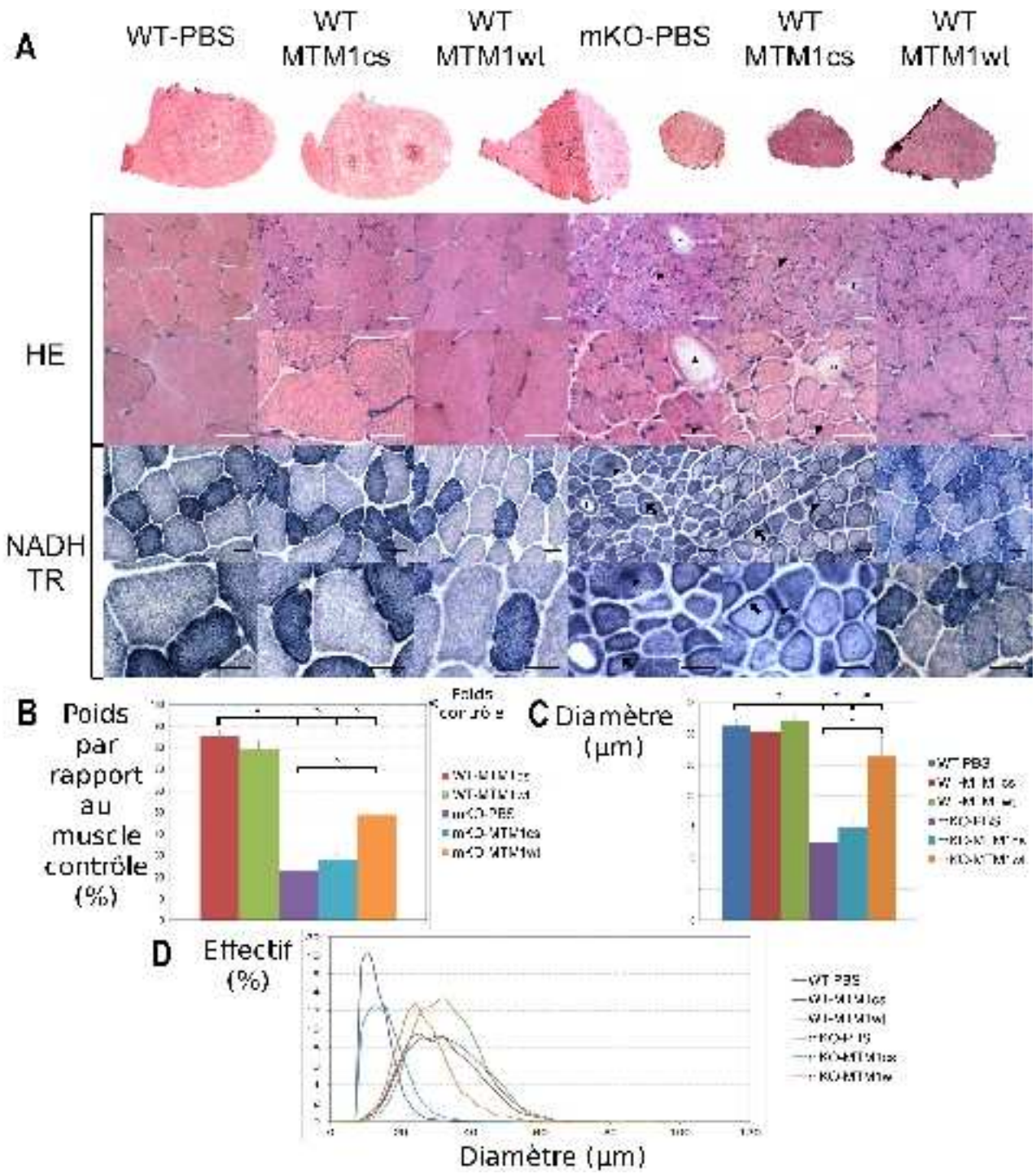
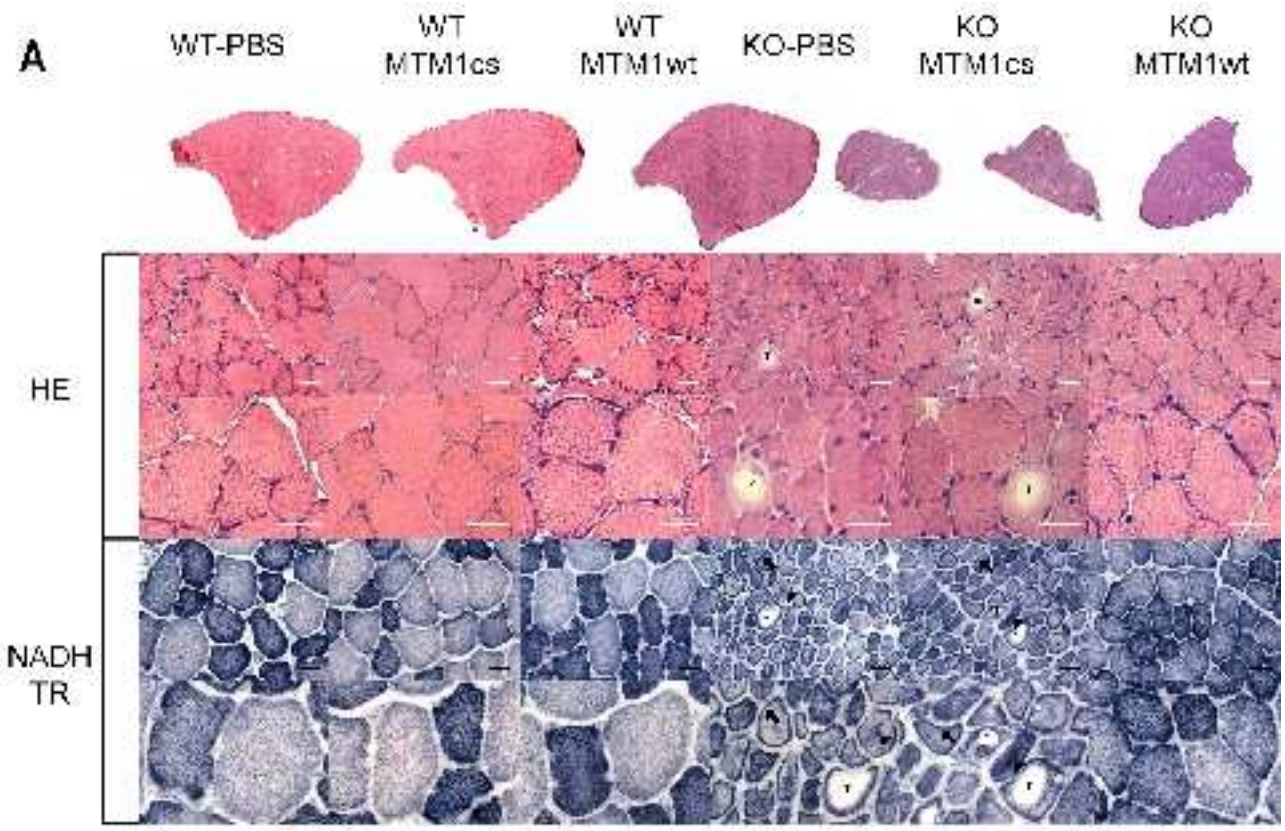
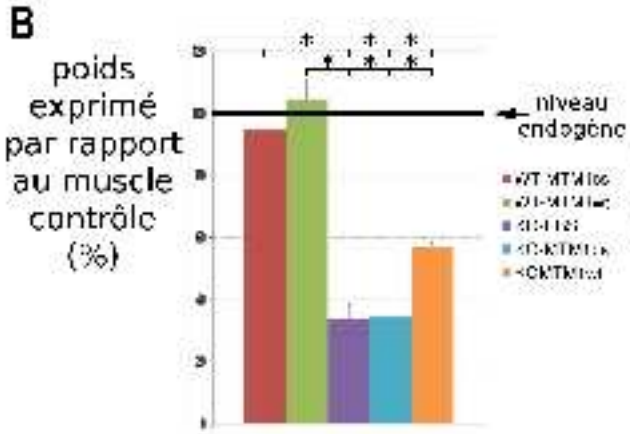

A
WT-PBS
WT MTM1cs
WT MTM1wt
mKO-PBS
WT MTM1cs
WT MTM1wt
HE
NADH TR
B
Poids par rapport au muscle contrôle (%)
C
Diamètre (µm)
D
Effectif (%)
Diamètre (µm)

Figure 22 : Morphologie des muscles tibialis antérieurs mKO 4 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt.

A/ Images *du Haut* : macroscopie de coupes transversales de tibialis antérieurs (TA) colorées à l'hématoxiline-éosine (HE) (WT-PBS : n = 3 ; mKO-PBS : n = 3 ; WT-MTM1cs : n = 5 ; WT-MTM1wt : n = 5 ; mKO-MTM1cs : n = 5 ; mKO-MTM1wt : n = 2). *Images du milieu (HE)* : agrandissement de coupes transversales de TA colorées à l'hematoxyline-éosine (WT-PBS : n = 3 ; mKO-PBS : n = 3 ; WT-MTM1cs : n = 5 ; WT-MTM1wt : n = 5 ; mKO-MTM1cs : n = 5 ; mKO-MTM1wt : n = 2). Étoiles : vacuoles dépourvues de matériel cellulaire. Tête de flèche : noyau internalisé. *Images du bas (NADH-TR)* : agrandissement des coupes transversales de TA colorées au NADH-TR. Flèche : regroupement en anneau des mitochondries et du RS à la périphérie de la myofibre. Tête de flèche : regroupement des mitochondries et du RS au centre de la myofibre. Les deux barres d'échelle différentes font 25 µm ; (* = P < 0,05). **B/** Poids moyen des TA (WT-PBS : n = 6 ; mKO-PBS : n = 3 ; WT-MTM1cs : n = 12 ; WT-MTM1wt : n = 5 ; mKO-MTM1cs : n = 5 ; mKO-MTM1wt : n = 2) ; (* = P < 0,05). **C/** Diamètre moyen des myofibres provenant des TA (WT-PBS : n = 7 ; mKO-PBS : n = 4 ; WT-MTM1cs : n = 4 ; WT-MTM1wt : n = 4 ; mKO-MTM1cs : n = 6 ; mKO-MTM1wt : n = 2) ; (* = P < 0,05). **D/** Profile de répartition de la taille des myofibres dans le TA (WT-PBS : n = 15089 ; mKO-PBS : n = 6353 ; WT-MTM1cs : n = 8018 ; WT-MTM1wt : n = 8236 ; mKO-MTM1cs : n = 12496 ; mKO-MTM1wt : n = 3520) ; (* = P < 0,05). Tête de flèche : augmentation de la portion des myofibres comprises entre 18 µm et 38 µm, dans le muscle mutant contenant MTM1cs.

RS = réticulum sarcoplasmique ; NADH-TR = nicotine-adénosine dinucléotide tétrazoléum réductase.


A
WT-PBS
WT MTM1cs
WT MTM1wt
KO-PBS
KO MTM1cs
KO MTM1wt
HE
NADH TR


B
poids exprimé par rapport au muscle contrôle (%)
niveau endogène

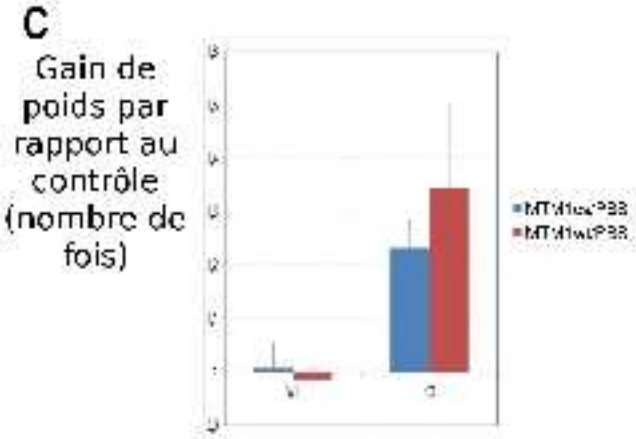

C
Gain de poids par rapport au contrôle (nombre de fois)

Figure 23 : Morphologie des muscles tibialis antérieurs KO 2 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt.

A/ *Images du haut* : les macroscopies de coupes transversales de tibialis antérieur après coloration à l'hématoxyline-éosine. *Images du milieu (HE)* : agrandissements des coupes transversales de TA colorées à l'hématoxyline-éosine. Étoile : vacuoles. *Images du bas (NADH-TR)* : agrandissements de coupes transversales de TA après coloration au NADH-TR. Étoile : vacuoles. Flèche : regroupement des mitochondries et du SR à la périphérie de la myofibre. Tête de flèche : regroupement des mitochondries et du SR au centre de la myofibre. (WT-PBS : n = 8 ; KO-PBS : n = 5 ; WT-MTM1cs : n = 4 ; WT-MTM1wt : n = 4 ; KO-MTM1cs : n = 3 ; KO-MTM1wt : n = 2). **B/** Poids moyen des TA (WT-PBS : n = 8 ; KO-PBS : n = 5 ; WT-MTM1cs : n = 4 ; WT-MTM1wt : n = 4 ; KO-MTM1cs : n = 3 ; KO-MTM1wt : n = 2) ; (* = P < 0,05). **C/** Différentiel entre le poids du muscle injecté avec le vecteur et son contrôle sur la même souris (WT-PBS : n = 8 ; KO-PBS : n = 5 ; WT-MTM1cs : n = 4 ; WT-MTM1wt : n = 4 ; KO-MTM1cs : n = 3 ; KO-MTM1wt : n = 2).

Les effets de la myotubularine active (MTM1wt) ou inactive (MTM1cs) sur l'organisation interne des myofibres malades sont étudiés par le marquage des protéines RY1, DHPR1a et dysferline, obtenu par immunodétection sur les coupes transversales de TA mKO, 4 semaines après l'injection intramusculaire du vecteur AAV1-DES-MTM1wt ou AAV1-DES-MTM1cs.

Le marquage du DHPR1α dans le TA contrôle contenant MTM1wt donne un signal de fluorescence sous forme de damier homogène sur l'ensemble de la coupe comme celui du muscle contrôle (Figure 24A, première et troisième série d'images). Le TA contrôle, contenant MTM1cs, présente, en plus du marquage normal, 10% de myofibres avec des accumulations de signal, sous forme de points (Figure 22A, deuxième série d'image). Le marquage du DHPR1α dans le muscle mutant mKO contenant MTM1cs est identique à celui du muscle mutant contrôle, et désorganisé par rapport au muscle normal (Figure 24A, quatrième et cinquième séries d'images). En revanche, le marquage du muscle mutant mKO contenant MTM1wt est identique à celui du muscle normal (Figure 22A, sixième série d'images).

Le marquage du RYR1 dans le muscle normal contenant MTM1cs ou MTM1wt est identique à celui du muscle normal (Figure 24B, première, deuxième et troisième séries d'images). Le TA mKO contenant MTM1cs présente un marquage désorganisé par rapport au muscle normal, mais identique à celui du muscle mutant contrôle (Figure 24B, quatrième et cinquième séries d'images). En revanche, le TA mutant mKO contenant MTM1wt présente un marquage du RYR1 identique à celui du muscle normal (Figure 24B, sixième série d'images).

Le marquage de la dysferline dans le TA normal, contenant MTM1wt, est identique à celui du TA normal (Figure 24C, première et troisième séries d'images). Le marquage dans le TA normal contenant MTM1cs est identique à celui du TA normal, mais un tiers des myofibres contiennent des accumulations du signal sous forme de points (Figure 24C, deuxième série d'images et 26A). Le muscle mutant mKO contenant MTM1cs présente un marquage de la dysferline identique à celui du muscle mutant contrôle et désorganisé par rapport au muscle normal (Figure 24C, quatrième et cinquième séries d'images). Le marquage dans le muscle mutant contenant MTM1wt est identique à celui du muscle contrôle (Figure 24A, sixième série d'images).

Ces résultats démontrent que la myotubularine inactive n'est pas capable de corriger l'organisation des trois marqueurs dans le muscle mutant, contrairement à la myotubularine active. Ils mettent également en évidence une action de la myotubularine inactive sur la localisation de la dysferline et du DHPR1α.

En conclusion, les différents résultats démontrent que l'activité phosphatase de la myotubularine est nécessaire pour pour qu'elle puisse corriger le phénotype musculaire de la myopathie myotubulaire.

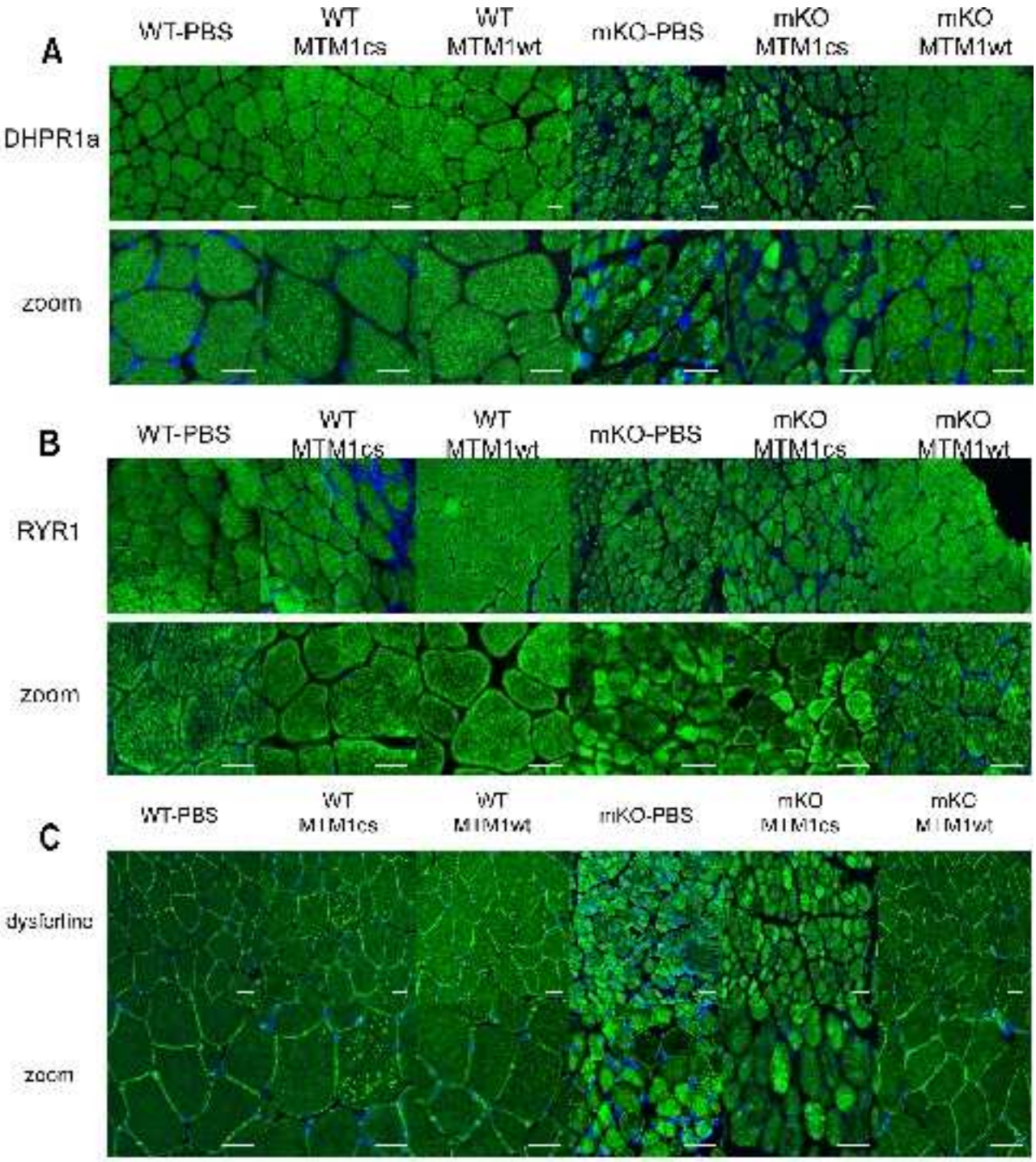

A
WT-PBS
WT MTM1cs
WT MTM1wt
mKO-PBS
mKO MTM1cs
mKO MTM1wt
DHPR1a
zoom
B
WT-PBS
WT MTM1cs
WT MTM1wt
mKO-PBS
mKO MTM1cs
mKO MTM1wt
RYR1
zoom
C
WT-PBS
WT MTM1cs
WT MTM1wt
mKO-PBS
mKO MTM1cs
mKO MTM1wt
dysferlin
zoom

Figure 24 : Marquage du RYR1 et du DHPR1α dans les muscles tibialis antérieurs mKO 4 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt.

A/ Immunodétection du DHPR1α (en vert) et des noyaux cellulaires (en bleu) sur des coupes transversales de tibialis antérieurs (WT-PBS : n = 3 ; mKO-PBS : n = 3 ; WT-MTM1cs : n = 3 ; WT-MTM1wt : n = 3 ; mKO-MTM1cs : n = 3 ; mKO-MTM1wt : n = 2). **B/** Immunodétection du RYR1 (en vert) et des noyaux (en bleu) sur des coupes transversales de tibialis antérieurs (WT-PBS : n = 3 ; mKO-PBS : n = 3 ; WT-MTM1cs : n = 3 ; WT-MTM1wt : n = 3 ; mKO-MTM1cs : n = 3 ; mKO-MTM1wt : n = 2). **C/** Immunodétection de la dysferline (en vert) et des noyaux (en bleu) sur des coupes transversales de TA (WT-PBS : n = 3 ; mKO-PBS : n = 3 ; WT-MTM1cs : n = 3 ; WT-MTM1wt : n = 3 ; mKO-MTM1cs : n = 3 ; mKO-MTM1wt : n = 2). Les barres d'échelles représentent 25 µm.

3.3.2 Effets de la myotubularine active et inactive sur le muscle normal

La présence de la myotubularine active (MTM1wt) ou inactive (MTM1cs) dans le muscle normal provoque l'apparition de vacuoles dans 25% des myofibres, visibles en histologie (Figure 25A).

J'ai entrepris la caractérisation de ces vacuoles pour en déterminer l'origine et comprendre les mécanismes qui guident leur formation. La première étape a été d'établir un lien avec la myotubularine en recherchant sa présence sur les coupes transversales de TA normal injecté avec le vecteur AAV1-CMV-MTM1c375s ou le vecteur AAV1-CMV-MTM1. La deuxième étape consiste à rechercher des marqueurs de ces vacuoles pour avoir des pistes d'investigation sur les mécanismes qui contrôlent la formation des vacuoles.

Étude de la présence de la myotubularine sur les vacuoles.

La présence de ces vacuoles a été constatée au cours des essais de l'impact de la myotubularine inactive sur le TA mutant mKO décrit précédemment (Buj-Bello et al., 2008).

La coloration hématoxilyne-éosine (HE) des coupes transversales de TA contrôles contenant MTM1wt ou MTM1cs montre la présence de vacuoles de petite taille qui, en coloration NADH-TR, ne contiennent ni de mitochondrie, ni de réticulum sarcoplasmique (RS). La taille des vacuoles est beaucoup plus faible que celles retrouvées dans le muscle mutant (Figure 25A).

Les résultats d'histologie montrent que ces vacuoles ne semblent pas contenir de matériaux cellulaires.

La détection de la myotubularine est réalisée par immunomarquage (vert) sur des coupes transversales de TA contenant MTM1wt ou MTM1cs. Deux types de marquage sont alors visibles.

Le premier est présent au niveau des coupes provenant de muscle contenant MTM1cs. Le signal est présent au centre de la fibre musculaire sous forme de points ou de vacuoles. Rarement, le signal est présent sous forme de larges vacuoles collées à la membrane plasmique (Figure 25A et B).

Le second marquage est sur les coupes provenant de muscle contenant MTM1wt. Le signal de fluorescence est présent sous forme de larges vacuoles à la périphérie de la fibre musculaire et

rarement, sous forme de points au centre (Figure 25A et C).

Les résultats d'immunomarquages montrent que les membranes de ces vacuoles contiennent de la myotubularine.

Afin de mieux caractériser ces marquages, l'ultrastructure de ces muscles est analysée par microscopie électronique. L'ultrastructure des muscles contrôles contenant MTM1cs ou MTM1wt révèle la présence d'accumulations de membrane sous forme d'empilements de vacuoles (Figure 25B et C).

Les résultats de la microscopie électronique montrent que les vacuoles sont constituées d'empilements membranaires.

En conclusion, ces résultats démontrent que les vacuoles visibles en histologie sont en réalité des accumulations membranaires qui contiennent de la myotubularine. Le type de myotubularine semble influencer la taille et la localisation de ces empilements membranaires dans la myofibre.

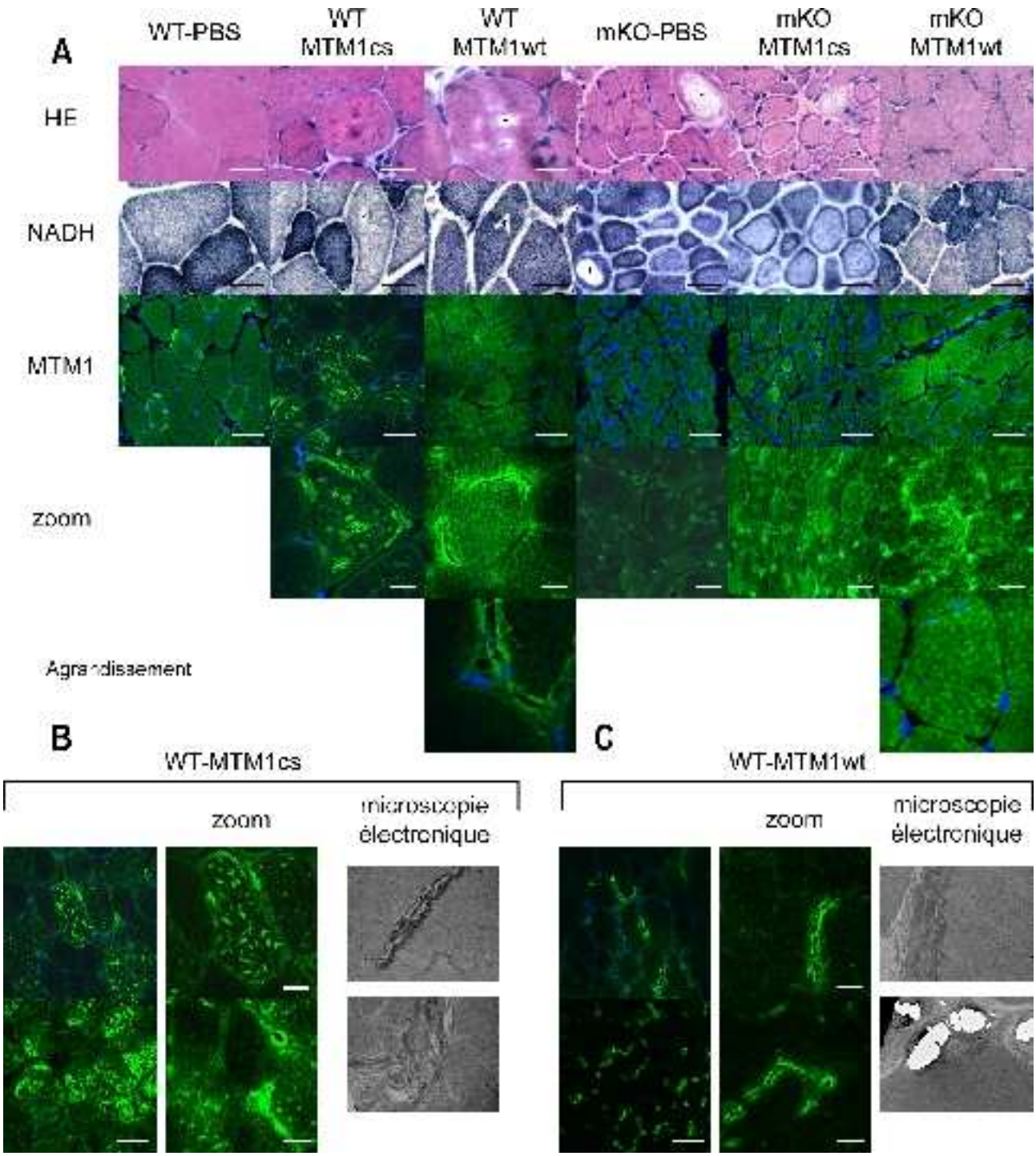

A
WT-PBS
WT MTM1cs
WT MTM1wt
mKO-PBS
mKO MTM1cs
mKO MTM1wt
HE
NADH
MTM1
zoom
Agrandissement
B
WT-MTM1cs
zoom
microscopie électronique
C
WT-MTM1wt
zoom
microscopie électronique

Figure 25 : Illustration des vacuoles présentes dans les muscles tibialis antérieurs mKO 4 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt.

A*/* *Images du haut* : agrandissement de fibres musculaires après coloration à l'hématoxyline-éosine. Étoile : vacuoles dépourvues de matériel cellulaire. *Images du milieu* : agrandissement de fibres musculaires après coloration au NADH-TR. Étoile : vacuoles dépourvues de matériel cellulaire. *Linges du bas* : immunodétection de la myotubularine (vert) et des noyaux (bleu) dans les TA. **B*/*** Caractérisation morphologique des vacuoles présentes dans le muscle contrôle injecté avec la myotubularine inactive. *A gauche* : immunodétection de la myotubularine (vert) et des noyaux (bleu) dans deux TA différents (n = 3). *A droite* : Microscopie électronique du TA (n = 2). **C*/*** Caractérisation morphologique des vacuoles présentes dans le muscle contrôle injecté avec la myotubularine active. *A gauche* : immunodétection de la myotubularine (vert) et des noyaux (bleu) dans deux TA différents (n = 3). *A droite* : Microscopie électronique du TA (n = 2).

Caractérisation de l'origine des vacuoles présentes dans les muscles sauvages contenant les deux formes de myotubularine

Si les empilements membranaires observés contiennent de la myotubularine, on peut aisément partir du principe qu'ils contiennent d'autres protéines. L'identification de ces protéines permettrait de trouver des pistes sur l'origine de la membrane des empilements et ainsi comprendre les mécanismes qui régissent leur formation. J'ai choisi d'explorer plusieurs pistes en recherchant la présence de différentes protéines dans les muscles contenant les empilements.

La première hypothèse sur l'origine de la membrane des empilements serait qu'elle proviendrait de la membrane plasmique. L'immunodétection de la dystrophine et la cavéoline sur des coupes transversales de TA contrôles contenant MTM1cs ou MTM1wt vont permettre de tester cette hypothèse.

La seconde hypothèse sur l'origine de la membrane des empilements serait qu'elle proviendrait d'une des deux membranes qui compose la triade. La triade, située dans la myofibre, est composée en partie par la membrane plasmique et de l'autre par la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS). La provenance de la membrane plasmique est vérifiée par le marquage du DHPR1α et de la dysferline sur les coupes transversales de TA contrôles contenant MTM1cs ou MTM1wt. La provenance du RS est vérifiée par le marquage des protéines RYR1 et la sarcaluménine, qui se situe au niveau des réservoirs de la triade, dans le RS ((Leberer et al., 1990) ; (Yoshida et al., 2005)).

La troisième hypothèse sur l'origine de la membrane des empilements est une conséquence de la solubilité de la desmine qui interagit avec la myotubularine. La surexpression de la desmine pourrait potentiellement provoquer une agglomération de la desmine. L'encombrement généré perturberait les protéines et les compartiments membranaires qui gravitent autour de ces deux protéines. L'immunodétection de la desmine sur les coupes de transversales de TA contrôles contenant MTM1cs ou MTM1wt, permettra de répondre à la question.

Le marquage de la dystrophine dans le muscle normal (WT-PBS) donne une localisation du signal au niveau de la membrane plasmique sur l'ensemble de la coupe. La présence de myotubularine active ou non dans ce même muscle donne le même marquage (Figure 26B, première série d'images à gauche).

Le marquage de la cavéoline dans le muscle mutant contrôle donne également une localisation du signal de fluorescence au sarcolemme. La présence de la myotubularine active ou non, dans le

muscle contrôle ne change pas le marquage endogène (Figure 26B, deuxième série d'images).

Ces résultats montrent que la myotubularine active (MTM1cs) ou inactive (MTM1wt) n'a pas d'influence sur la localisation de la dystrophine et de la cavéoline. Les deux protéines ne semblent pas être impliquées dans la formation des empilements membranaires.

Le marquage de la sarcaluménine dans le muscle contrôle donne un marquage cytoplasmique sous forme de points plus ou moins définis. La présence de myotubularine active ou non dans le muscle contrôle ne modifie pas le marquage contrôle de la sarcaluménine (Figure 26B, troisième série d'images).

La présence de la myotubularine active ou inactive dans le muscle normal n'a pas d'influence sur la localisation du RYR1 (Figure 24B).

La présence de la myotubularine inactive dans le muscle normal change la localisation des protéines DHPR1α et dysferline dans une partie des myofibres (Figure 24A et 24C).

Ces résultats montrent que les protéines sarcaluménine et RYR1 ne participent pas à la formation des empilements membranaires contrairement aux protéines DHPR1α et dysferline.

L'immunodétection de la desmine dans le muscle contrôle montre un marquage partiellement membranaire et sous forme de stries parallèles, dans le cytoplasme (Figure 26C, image en haut à gauche). La présence de myotubularine active ou non dans ce même muscle ne change pas le marquage (Figure 26C, images de gauche). Le muscle mutant contrôle présente un marquage de la desmine, sous forme d'agglomérations cytoplasmiques du signal, différent de celui du muscle normal (Figure 26C, image en haut à droite). La présence de la myotubularine active ou inactive dans le muscle mutant mKO fait disparaître les agglomérats au profit des stries parallèles, comme dans le muscle normal (Figure 26C, images du milieu et du bas, à droite).

Ces résultats montrent que la desmine ne participe pas à la formation des empilements membranaires.

Conclusion sur la caractérisation de l'origine des vacuoles présentes dans les muscles sauvages contenant les deux formes de myotubularine

L'altération de la localisation du DHPR1α et de la dysferline semble indiquer que la membrane qui constitue ces empilements pourrait être liée à la membrane des T-tubules de la triade.

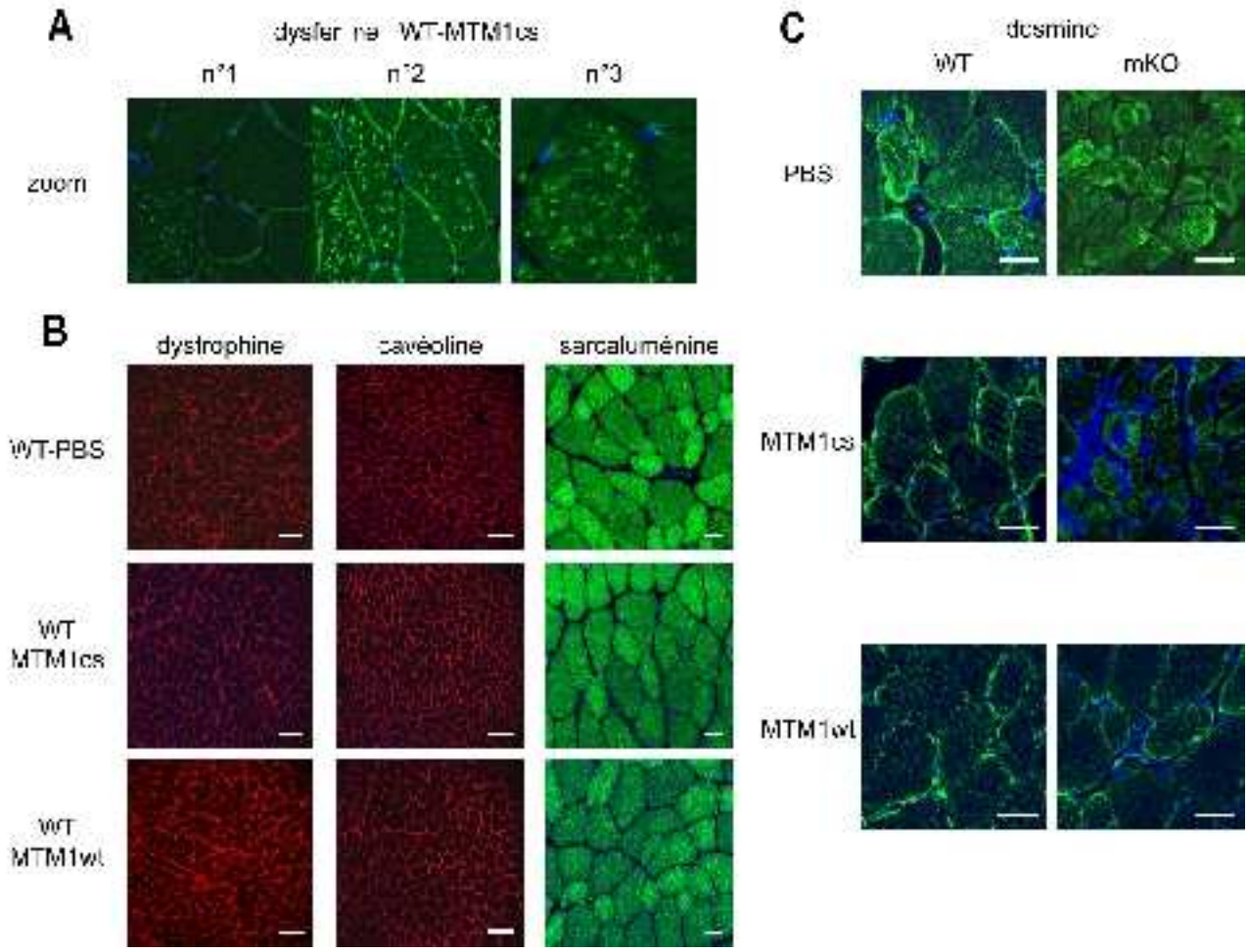


Figure 26 : Caractérisation des vacuoles présentes dans les muscles tibialis antérieurs mKO 4 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt.

A/ Immunodétection de la dysferline (en vert) et des noyaux (en bleu) sur des coupes transversales de TA provenant de muscles contrôles injectés avec le vecteur AAV1-CMV-MTM1cs (n = 3). **B/** Détection de la dystrophine, de la cavéoline et de la sarcaluménine dans des TA contrôles traités avec les deux vecteurs. *Images de droite* : immunodétection de la dystrophine (en rouge), un marqueur membranaire, et des noyaux (en bleu). *Images du milieu* : immunodétection de la cavéoline (en rouge), un marqueur membranaire, et des noyaux (en bleu). *Images de gauche* : immunodétection de la sarcaluménine (en rouge), un marqueur du RS, et des noyaux (en bleu). (WT-PBS : n = 2 ; WT-MTM1cs : n = 2 ; WT-MTM1wt : n = 2). **C/** Immunodétection de la desmine (en vert) et des noyaux (en bleu) dans les TA (WT-PBS : n = 3 ; mKO-PBS : n = 3 ; WT-MTM1cs : n = 3 ; WT-MTM1wt : n = 3 ; mKO-MTM1cs : n = 3 ; mKO-MTM1wt : n = 2).

Présence d'infiltrats cellulaires dans les muscles normaux contenants **la myotubularine active ou inactive.**

Le premier essai de thérapie génique sur la myopathie myotubulaire a soulevé la question d'une éventuelle réponse immunitaire contre la trop forte quantité de protéines thérapeutiques dans la myofibre du muscle mutant (Buj-Bello et al., 2008). Ce fait m'a enjoint à rechercher les signes d'une éventuelle réponse immunitaire dans les expériences menées avec les vecteurs AAV1-CMV-MTM1c375s et AAV1-CMV-MTM1. J'ai donc recherché, chez les souris normales traitées avec les vecteurs, la présence d'infiltrats cellulaires et quantifié l'expression du TNF-α, une cytokine présente au cours d'inflammation, dans ces muscles.

La détection des infiltrats cellulaires est réalisée sur des coupes transversales de TA, colorées à l'hématoxyline-éosine, provenant des souris 129-PAS (fond génétique du modèle KO) et C57BL\6 (fond du modèle mKO) des expériences précédentes.

Des infiltrats sporadiques sont présents dans les muscles normaux C57BL\6 contenants MTM1cs et MTM1wt. Un infiltrat cellulaire est détecté dans un des muscles mutants mKO contenant MTM1cs (Figure 27A, images du haut). Un infiltrat sporadique est détecté sur un des quatre TA normal 129-PAS, contenant MTM1cs ou MTM1wt (Figure 27A, image du bas). Les autres muscles analysés ne présentent pas d'infiltrats cellulaires.

L'immunodétection de la myotubularine dans le muscle contenant MTM1cs montre que les infiltrats cellulaires sont localisés autour de myofibres qui contiennent des empilements membranaires et beaucoup de protéines transgéniques (Figure 27B).

La quantification de l'expression du TNF-α dans le TA des souris C57BL\6 (modèle mKO). L'expression du TNF-α est beaucoup plus importante dans le muscle contrôle contenant MTM1cs ou MTM1wt que par rapport au muscle normal. L'expression du TNF-α dans le muscle mutant contrôle ou contenant MTM1wt semble identique à celui du muscle normal, tandis que dans le TA mKO contenant MTM1cs le niveau semble plus faible que celui du TA normal (Figure 27C).

Ces résultats semblent montrer qu'une trop forte quantité de myotubularine dans le muscle provoque l'apparition d'une réponse immunitaire localisée au niveau des fibres musculaires qui contiennent une trop grande quantité de protéine.

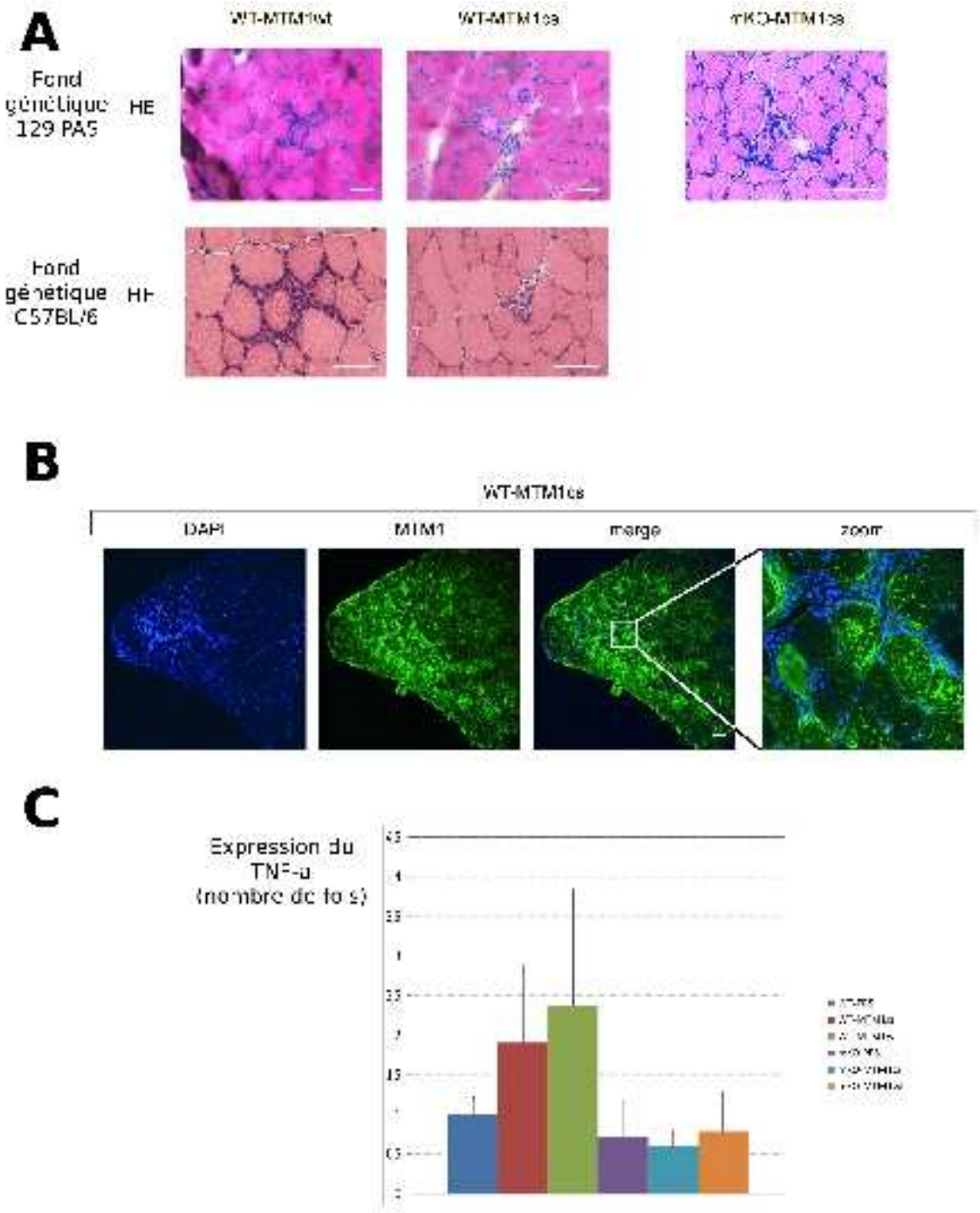

A
WT-MTM1wt
WT-MTM1cs
KO-MTM1cs
Fond génétique 129 PAS
HE
Fond génétique C57BL/6
HE
B
WT-MTM1cs
DAPI
MTM1
merge
zoom
C
Expression du TNF-α (nombre de fois)

Figure 27 : Infiltrats cellulaires dans les muscles tibialis antérieurs mKO 4 semaines après injection des vecteurs AAV1-CMV-MTM1cs et AAV1-CMV-MTM1wt.

A/ *Images du haut (HE)* : coupes transversales de tibialis antérieur provenant de souris mutantes mKO et de fond génétique C57BL/6, colorées à l'hématoxyline-éosine (WT-MTM1cs : n = 3 ; WT-MTM1wt : n = 3). *Images du bas (HE)* : coupes transversales de tibialis antérieur provenant de souris de fond génétique 129PAS, colorées à l'hématoxyline-éosine (WT-MTM1cs : n = 1 ; WT-MTM1wt : n = 1). Les barres d'échelles représentent 25 µm. **B/** Immunodétection de la myotubularine (en vert) et des noyaux (en bleu) sur une coupe transversale de TA injecté avec le vecteur AAV1-CMV-MTM1cs. La barre d'échelle représente 100 µm. **C/** Niveau d'expression du TNF-α, une cytokine inflammatoire, dans les TA (WT-PBS : n = 5 ; mKO-PBS : n = 3 ; WT-MTM1cs : n = 9 ; WT-MTM1wt : n = 6 ; mKO-MTM1cs : n = 5 ; mKO-MTM1wt : n = 2) ; (* = $P < 0,05$).

4 Discussion

4.1 Discussion sur le développement du traitement de la myopathie myotubulaire par la thérapie génique

Les travaux effectués chez la souris démontrent la capacité de la cassette thérapeutique desmine-MTM1 à améliorer la survie des animaux malades. Une seule injection de vecteur permet la présence d'une quantité de protéine thérapeutique qui corrige la pathologie musculaire. Les muscles réparés retrouvent une fonction normale ce qui permet un développement normal de l'animal et un retour à une survie normale des animaux. La stratégie de thérapie génique développée pour le traitement de la myopathie myotubulaire est très efficace en comparaison avec d'autres approches thérapeutiques telles que celle de Lawlor et ses collaborateurs. Ils ont choisi de développer un traitement pharmacologique indirect pour soigner la maladie en agissant sur la voie de la myostatine qui lorsqu'elle est inhibée, le muscle gagne en masse. Les effets sur le modèle murin de la myopathie myotubulaire sont faibles car la durée de vie n'est prolongée que de quelques semaines. Les effets sur la morphologie du muscle sont transitoires et il semble que le muscle devienne insensible au traitement au bout de quelques semaines (Lawlor et al., 2011).

Le choix du promoteur synthétique de la desmine permet une bonne restriction de la protéine thérapeutique au niveau du muscle. Peu d'organes différents du muscle contiennent la protéine thérapeutique. Néanmoins le promoteur ne semble pas permettre de distinguer les différents muscles puisque la protéine thérapeutique est retrouvée dans le cœur et le muscle.

La spécificité procurée par le promoteur de la desmine ouvre des perspectives pour l'étude des effets de l'absence de myotubularine dans certains organes sur une longue période. L'histologie des testicules provenant des souris mutantes injectées avec le vecteur démontre pour une grande proportion d'entres elles, des anomalies histologiques importantes. Certaines de ces anomalies sont semblables à des anomalies testiculaires observées chez des souris dépourvues d'MTMR2, un homologue de la myotubularine (Bolino et al., 2004). MTMR2 remplit un rôle dans la spermatogenèse en participant au recyclage de certaines protéines d'adhésion présentes à l'apex des cellules de Sertoli (Mruk et al., 2010). L'absence d'une atteinte de l'ensemble des testicules analysés indique que le phénomène pourrait être complémenté par d'autres mécanismes.

Le promoteur desmine permet également une grande flexibilité pour moduler la quantité de protéine thérapeutique dans le muscle. Les expériences effectuées dans les deux modèles murins de la myopathie myotubulaire montrent que la réduction de dose de vecteur d'un logarithme, permet

d'atteindre une quantité physiologique de protéine thérapeutique dans le muscle. Le contrôle de la quantité thérapeutique de protéine dans le muscle est primordial.

La stabilité de la quantité de protéine thérapeutique au cours du temps est un premier indicateur d'une éventuelle réponse immunitaire contre le transgène comme le montrent les études effectuées lors du développement d'un traitement pour l'hémophilie ((Fields et al., 2000) ; (Herzog et al., 2002)). Dans notre cas, la quantité de protéine thérapeutique est stable même un an après l'injection. Ce fait indique que le vecteur ne semble pas provoquer de réponse immunitaire.

L'importance du contrôle de la quantité de protéine thérapeutique dans le muscle se situe également au niveau du contrôle de l'efficacité de fonctionnement de la protéine thérapeutique et des conséquences d'éventuels dysfonctionnements.

La quantité minimale de protéine thérapeutique nécessaire pour corriger le phénotype de la myopathie myotubulaire semble basse. La présence résiduelle d'activité phosphatase dans le muscle du modèle développer par Pierson et ses collaborateurs en comparaison de notre modèle, permet d'améliorer l'espérance de vie des souris et le phénotype de la maladie (Pierson et al., 2012).

En trop grande quantité la myotubularine peut provoquer des problèmes, notamment par une perte du contrôle de l'activité enzymatique . L'absence d'un tel contrôle a des conséquences sur ces rôles biologiques, comme le contrôle du remodelage des membranes (Buj-Bello et al., 2008) et du cytosquelette d'actine (Ribeiro et al., 2011), ou la dégradation de certains récepteurs (Cao et al., 2007). Les conséquences peuvent se manifester par l'accentuation de phénomènes, comme l'augmentation des plaques de collagène dans le cœur des souris mutantes KO. Cependant ce phénomène semble cantonné au fond génétique des souris puisque, dans le modèle mKO, le cœur qui contient 45 fois plus de myotubularine que le niveau endogène ne présente pas de plaque de collagène ni de modification de son poids (Annexe 1A ; Annexe 1B ; Annexe 1C). Une étude plus approfondie du phénomène d'apparition des plaques de collagène permettrait de mettre en évidence l'importance du phénomène par rapport au fonctionnement du muscle cardiaque.

La preuve que notre nouvelle cassette thérapeutique est fonctionnelle et efficace pour toucher l'ensemble des muscles de l'organisme atteints de myopathie myotubulaire permet de franchir une étape de plus dans le développement du traitement par la thérapie génique. Il est désormais envisageable d'extrapoler cette expérience à un animal plus gros que la souris. La transposition du concept thérapeutique sur un animal supérieur nécessite d'adapter le transgène thérapeutique à l'espèce dans laquelle la preuve d'efficacité sera réalisée. Le changement d'animal

modèle met en jeu un changement d'échelle dans la détermination des doses et des volumes nécessaires à la mise en place du protocole d'évaluation du traitement.

Un nouveau vecteur comprenant l'ADNc de la myotubularine canine sous la dépendance du promoteur desmine, est créé. L'efficacité de ce vecteur est déterminée localement chez le chien atteint de myopathie myotubulaire. Le nouveau vecteur est capable d'apporter des quantités de protéine thérapeutique proches du niveau endogène. La protéine est fonctionnelle puisqu'elle corrige le phénotype pathologique musculaire. La stratégie d'adaptation du transgène à l'espèce permet de conserver les caractéristiques thérapeutiques du transgène et semble préserver d'une réaction immunitaire contre le transgène.

L'étude du vecteur chez le chien permet d'avancer dans le développement du traitement chez l'homme et plusieurs jalons apparaissent.

Le premier jalon est physique puisqu'il concerne la quantité de vecteur nécessaire pour transduire un organisme de grande taille comme le chien, le primate ou l'homme. Actuellement, le volume de vecteur nécessaire pour un patient atteint de la myopathie de Duchenne est estimé à plus de 10^{14} $vg.kg^{-1}$ (Galibert et al., 2011). Les capacités de production actuelles ne permettent pas d'obtenir une quantité de virus aussi importante, mais plusieurs solutions sont explorées comme par exemple la production des virus dans les cellules d'insectes grâce au baculovirus (Galibert et al., 2011).

Cette piste conditionne la suite de la stratégie à employer pour administrer le vecteur au patient. Une des stratégies envisageables est de concentrer le développement du vecteur sur les symptômes les plus graves des patients. Dans le cas de la myopathie myotubulaire, les symptômes respiratoires sont importants. Le traitement pourrait donc se focaliser sur des injections locales du vecteur au niveau du diaphragme et de la cage thoracique pour améliorer la respiration des patients.

Une autre stratégie envisageable est l'injection du vecteur très tôt après la naissance. Cette stratégie est rendue possible par la détection précoce ((Chen et al., 2010) ; (Tosch et al., 2010)) des mutations chez les patients. Les essais de mise au point des doses thérapeutiques peuvent être aisément réalisés chez le chiot ou le primate. Une étude sur le modèle canin pour la dystrophie de Duchenne a montré l'efficacité de correction du phénotype musculaire à l'échelle du corps entier lors de l'injection néonatale d'une dose de vecteur thérapeutique (Yue et al., 2008). Cette même étude et d'autres travaux ont démontré l'efficacité d'inhibition de la réponse immunitaire contre le vecteur lors d'injections néonatales ((Yue et al., 2008) ; (Xu et al., 2007)).

Les deux stratégies sont compatibles avec la mise en place d'un protocole d'étude de toxicité du transgène sur l'organisme d'animaux contrôles comme le chien ou le primate. Cette démarche permettra de renforcer le profil de sécurité des vecteurs de thérapie génique dérivés des AAV et de s'approcher des démarches de sécurité mises en place pour le développement d'un traitement pharmacologique.

4.2 Discussion des effets de la protéine MTMR2 sur le muscle KO

Les effets thérapeutiques obtenus avec MTMR2 sur le phénotype de la myopathie myotubulaire sont faibles en comparaison des effets thérapeutiques de la protéine MTM1 dans des conditions expérimentales identiques.

La différence de quantité de protéines thérapeutique MTMR2 entre le muscle sain et le muscle malade peut expliquer les faibles effets thérapeutiques sur le muscle. La question qui en découle est de déterminer si l'augmentation de la quantité de protéine thérapeutique dans le muscle malade provoquera une meilleure correction du phénotype musculaire. Notre tentative pour augmenter la quantité de protéine dans le muscle avec le vecteur AAV9-DES-MTMR2 s'est soldée par un échec aux raisons inconnues. La première étape dans la compréhension de cet échec est de comparer la quantité de protéine thérapeutique présente dans les muscles contrôles injectés avec les deux vecteurs. L'expérience permettra de déterminer si la dose de vecteur AAV9-DES-MTMR2 apporte plus de protéines MTMR2 dans le muscle contrôle par rapport à l'autre vecteur. Les expériences que j'ai réalisé ne permettent pas de faire la comparaison avec mes résultats car ils ont été obtenus à des temps différents.
La comparaison des quantités de protéine est déterminante car les sérotypes AAV1 et AAV9 entre dans la cellule grâce à différents récepteurs (Schultz et al., 2008), et leurs comportements au cours d'un procédé d'injection identique ne sont pas identiques (Zincarelli et al., 2008). De plus, mes expériences avec les deux vecteurs montrent une réduction de protéine thérapeutique entre le muscle normal et le muscle malade. La diminution de quantité de protéines est plus importante dans le cas du vecteur AAV9 par rapport au vecteur AAV1. Ce fait complique l'explication de l'échec de notre tentative d'augmentation de la protéine thérapeutique dans le muscle malade. En effet, si les vecteurs AAV1 et AAV9 n'ont pas le même comportement dans le muscle sain, ils peuvent également avoir un comportement différent dans le muscle malade. Dans ce cas la comparaison de la quantité de protéine MTMR2 entre le muscle mutant injecté avec le vecteur AAV1 et le muscle mutant injecté avec le vecteur AAV9 apportera une idée sur la différence de quantité de protéine.

L'étape suivante dans la compréhension du phénomène sera de comparer le nombre de génomes

viraux entre les différents muscles contrôles et mutants injectés avec les deux vecteurs.

Une autre stratégie pour augmenter la quantité de protéines MTMR2 dans le muscle consisterait à choisir un autre promoteur plus puissant tout en gardant le sérotype 1 des AAV. Une étude comparative de la capacité d'expression des promoteurs CMV, CMV/β-globine (Herzog et al., 1999), Spc5-12 (Foster et al., 2008) par rapport au promoteur desmine permettrait de déterminer celui qui permet la plus forte expression dans le muscle contrôle. L'efficacité de la cassette thérapeutique doit être établie dans le modèle mKO car il permet d'avoir une cinétique d'expression plus grande dans le cas d'injections intramusculaires.

L'action thérapeutique d'MTMR2 sur le muscle déficient en myotubularine met en évidence des perspectives intéressantes au niveau de la compréhension du mécanisme d'action de la protéine MTM1 dans le muscle et le développement d'un traitement pharmacologique. Afin de combiner ces deux recherches, il faudrait utiliser la technique, développée par Vandenburgh et ses collaborateurs, qui consiste à recréer un muscle miniature (ou mBAMs) en plaque 96 puits, sur deux électrodes ce qui permet de déclencher la contraction (Vandenburgh et al., 2008).
La première étape serait d'obtenir des cellules musculaires de patients atteints de myopathies myotubulaires dont la partie du gène MTMR2 serait marquée par l' eGFP grâce à des nucléases en doigt de Zing (ZNF). En effet, le développement de la technologie des ZNF permet aujourd'hui d'avoir accès à des nucléases qui peuvent spécifiquement cibler une partie du génome et induire une coupure. Cette coupure favorise la recombinaison homologue entre brins d'ADN (Kandaveloun et al., 2009). L'utilisation de ces myoblastes pour fabriquer des muscles miniatures constituerait un modèle de crible positif de composés pharmacologiques induisant l'expression d'MTMR2. Ensuite, l'action de MTMR2 sur la force serait directement enregistrée.
La deuxième partie des expériences consisterait à utiliser les mBAMs pour étudier les mécanismes impliqués dans le rôle d'MTMR2 sur la force musculaire et en même temps, identifier les mécanismes de fonctionnement d'MTM1 sur la force musculaire. Le système des mBAMs présente plusieurs avantages qui permettent de suivre des interactions *in vivo*. Les muscles artificiels peuvent être observés en microscopie normale et confocale. Les muscles peuvent également être transfecté avec diverses constructions marquées par différentes méthodes. Enfin l'utilisation de plaque 96 puits, permet de faire un nombre important d'expériences.

4.3 Discussion sur le rôle de l'activité phosphatase de la myotubularine dans son action thérapeutique sur la myopathie myotubulaire

Les expériences menées avec le mutant inactif de la myotubularine ne laissent pas d'équivoque quant à la nécessité de l'activité phosphatase de la myotubularine pour restaurer l'ensemble du phénotype musculaire de la myopathie myotubulaire. Les travaux d'Hnia et ses collaborateurs sur la mise en évidence d'un lien entre la myotubularine et la dysferline laissaient planer le doute sur l'importance de cette interaction au niveau du muscle (Hnia et al., 2011). Mes expériences prouvent clairement que l'activité phosphatase est essentielle à la myotubularine pour remplir ces rôles biologiques. Néanmoins, elles mettent également en évidence un rôle secondaire du corps de la protéine sur la modulation de la masse musculaire. On peut donc émettre l'hypothèse que le lien entre la myotubularine et la desmine et ses conséquences sur le fonctionnement des mitochondries peut jouer un rôle sur la masse musculaire.

Ce rôle biologique pourrait également être responsable de l'augmentation du poids observée dans les travaux avec le transgène MTMR2. L'identification et la véracité d'un tel lien permettraient d'isoler le rôle biologique musculaire commun à la myotubularine et MTMR2.

La caractérisation des empilements membranaires présents dans le muscle normal contenant une très forte quantité de myotubularine active ou inactive met en évidence des pistes d'investigation pour comprendre les mécanismes de fonctionnement de la myotubularine dans le muscle. De plus, ces pistes d'investigation se recoupent avec d'autres recherches.

Les investigations d'Al-qusairi et ses collaborateurs ont montré que la myotubularine contrôle le fonctionnement du DHPR en participant à la régulation de plusieurs de ses sous-unités (Al-Qusairi et al, 2009). Plusieurs travaux montrent que le fonctionnement du DHPR est régulé par l'expression de différentes isoformes. En effet, Ursu et ses collaborateurs ont démontré que l'absence de la sous-unité gamma du DHPR dans des fibres musculaires de souris adultes provoque une réduction du temps d'inactivation du canal suite à l'entrée et au relargage du calcium. La sous-unité joue donc le rôle d'inhibiteur de l'activation du DHPR (Ursu et al., 2004)**.** Andronache et ses collaborateurs ont également montré que la sous-unité gamma se comportait et interagissait avec certaines molécules qui possèdent également la capacité à maintenir le DHPR inactivé (Andronache et al., 2007). Sipos et ses collaborateurs ont démontré que la surexpression de la sous-unité gamma avec la sous-unité alpha1s dans des cellules HEK293 provoque l'inhibition de l'activation du DHPR1αs (Sipos et al.,

2000). Toutes ces données permettent d'établir un modèle théorique du fonctionnement de la myotubularine dans le muscle qui passe par le contrôle de l'expression et/ou la localisation d'une ou plusieurs sous-unités du complexe du DHPR.

La présence d'accumulations du marqueur DHPR1α, qui est l'une des sous-unités du DHPR renforce l'idée du rôle que joue la myotubularine dans le contrôle de l'expression des différentes sous-unités du DHPR.

L'identification de la dysferline comme marqueur spécifique des muscles contrôles contenant la myotubularine inactive, caractéristique retrouvée dans les muscles mutants, est une deuxième piste d'investigation du mécanisme de fonctionnement de la myotubularine dans le muscle. Cette voie d'investigation pourrait également permettre de comprendre le rôle que joue la myotubularine dans le contrôle du DHPR.

Un des rôles biologiques émergeant de la dysferline se trouve dans la formation de la triade et plus spécifiquement dans le contrôle du passage des tubules longitudinaux en position transversale. Klinge et ses collaborateurs ont démontré dans un modèle de formation de myotubes, que la dysferline co-localisait, dans le cytoplasme, avec Bin1 au niveau des tubules longitudinaux (ou l-tubules) de façon dépendante du cholestérol. Au cours de la maturation des myotubes, les tubules deviennent transverses, la dysferline passe d'une localisation exclusivement cytoplasmique à une localisation quasi exclusivement membranaire (Klinge et al., 2007). Les mêmes auteurs apportent ensuite la preuve de leur modèle *in vivo*. En début de maturation des tubules, la dysferline colocalise avec la cavéoline, qui marque les premières étapes de la maturation des tubules. La dysferline colocalise ensuite avec le DHPR, pendant et après la transition en T-tubules. En parallèle, la dysferline disparait du cytoplasme presque complètement au profit d'une localisation à la membrane plasmique. Klinge et ses collaborateurs montrent également le rôle primordial de dysferline dans la maturation des T-tubules car chez le modèle murin de dysferlinopathie, les tubules sont très majoritairement longitudinaux et élargis (Klinge et al., 2010). La dysferline contrôlerait la croissance du l-tubule et permettrait la mise en place du tubule transverse par sa disparition du cytoplasme.

Le contrôle exercé par la myotubularine sur les différentes sous-unités du DHPR pourrait passer par le contrôle de la localisation de la dysferline via un groupe de phosphoinositides communs.

La myotubularine ne remplit **ces** rôles biologiques qu'en contrôlant des groupes de PI3P ou de PI3,5P_2 localisés à différents endroits dans la cellule, grâce à son activité phosphatase. L'interaction

avec différentes protéines lui permet de se localiser à différents endroits. L'absence de myotubularine dans le muscle et la cellule provoque l'accumulation localisée de PI3P ((Dowling et al., 2009) ; (Velichkova et al., 2010)) et de PI3,5P_2 (Hnia et al., 2011). La dysferline possède 7 domaines protéiques C2 qui ont des spécificités membranaires différentes (Klinge et al., 2007).
On peut donc supposer que l'un des domaines C2 de la dysferline est capable de lier les PI3P et PI3,5P_2. Sur ce principe, la présence d'une trop forte quantité de l'un de ces PI séquestre la dysferline dans le cytoplasme. Étant donné que la dysferline interagit avec le DHPR (Ampong et al., 2005), elle peut séquestrer une sous-unité du récepteur et empêcher la migration des T-tubules. En revanche, dans un cas physiologique, la myotubularine hydrolyse ce groupe de PI3P ou PI3,5P_2 et la dysferline disparaît du cytoplasme en libérant la sous-unité.

Le contrôle de la localisation de la dysferline pourrait être indirect et faire intervenir une ou plusieurs protéines intermédiaires. La myotubularine contrôlerait alors cet intermédiaire par un groupe de phosphoinositides communs. AHNAK et l'annexine 2 sont deux interacteurs potentiels crédibles.
AHNAK interagit avec la sous-unité β2 du DHPR dans le cœur pour réguler son activité (Haase, 2007). Dans le muscle squelettique, AHNAK, via son domaine C-ter, interagit avec le domaine C2A de la dysferline. Elles co-localisent à la membrane plasmique, et au niveau des T-tubules avec le DHPR (Huang et al., 2007). AHNAK peut interagir avec la dysferline pour moduler sa liaison avec la sous-unité β du DHPR au niveau des endosomes. L'interaction entre AHNAK et la dysferline provoque un changement dans la composition du complexe protéique au niveau des endosomes, ce qui induit le recrutement de la myotubularine pour hydrolyser le groupe de PI3P ou PI3,5P_2 qui fixent le complexe protéique. La conséquence de l'action de la myotubularine est une disparition de la dysferline du cytoplasme. En l'absence de myotubularine le processus est bloqué et la dysferline reste dans le cytoplasme. Cependant, l'interaction entre AHNAK et la dysferline semble primordiale pour la réparation membranaire, mais pas pour les autres fonctions que remplit la dysferline (Huang et al., 2007). L'hypothèse est peu probable car chez le mutant MTM1 la dysferline est présente à la membrane plasmique et il n'y a pas de destruction de fibre musculaire.

Le deuxième candidat est l'annexine 2. La dysferline interagit avec l'annexine 2 lors du processus de réparation membranaire (Lennon et al., 2003). L'annexine 2 est également présente au niveau des endosomes précoces (Emans et al., 1993), où elle participe à la formation des endosomes tardifs (Morel et al., 2007) et des corps multivésiculaires (MVB) (Mayran et al., 2003). L'annexine 2 forme

des microdomaines sur les endosomes précoces, qui servent de plateforme de départ pour les vésicules en direction des endosomes tardifs dans la voie de dégradation (Mayran et al., 2003). La localisation de l'annexine 2 sur les endosomes précoces ou tardifs est régulée par différents facteurs ((Jost et al., 1997); (Morel et al., 2009)). Plusieurs modèles animaux et cellulaires ont mis en évidence que la myotubularine se trouve au niveau des endosomes précoces et tardifs ((Cao et al., 2007) ; (Velichkova et al., 2010) ; (Ribeiro et al., 2011)) où l'interaction avec d'autres protéines régule sa localisation (Cao et al., 2007), son activité phosphatase (Cao et al., 2008) et la modification du complexe protéique nécessaire à la maturation de l'endosome ((Velichkova et al., 2010) ; (Ribeiro et al., 2011)). Dans le modèle murin de la myopathie myotubulaire on retrouve une très forte concentration de dysferline dans le cytoplasme. Le modèle murin présente une quantité anormalement élevée de tubules longitudinaux par rapport au muscle contrôle à un très jeune âge. La quantité de l-tubules augmente avec le développement de la maladie (Al-Qusairi et al, 2009). De plus, mes expériences ont montré que la présence de myotobularine inactive provoquait la réapparition du marquage cytoplasmique de la dysferline. Dans notre hypothèse, l'annexine 2 servirait d'ancre à la dysferline pour la maintenir dans le cytoplasme et l'empêcher de remplir son rôle dans la maturation des T-tubules. L'action peut se dérouler au niveau des endosomes précoces. En absence de myotubularine sur ces endosomes, l'annexine resterait prisonnière du groupe de PI3P et ce faisant elle bloquerait la dysferline qui ne pourrait plus remplir son rôle au niveau des T-tubules. La dysferline séquestrerait une des sous-unités du DHPR ce qui dérégulerait les autres. En présence de myotubularine, l'annexine disparaît des endosomes grâce à l'hydrolyse du PI3P. La dysferline peut remplir son rôle au niveau de la maturation des T-tubules. L'action peut également se dérouler au niveau des endosomes tardifs. La dysferline entre en contact avec l'annexine 2 au niveau des endosomes précoces. Le complexe est envoyé aux endosomes tardifs. Dans le cas où la myotubularine est absente, les vésicules restent au niveau des endosomes tardifs. La dysferline piégée ne peut plus remplir son rôle. En présence de myotubularine, les deux protéines sont libérées et peuvent reprendre leur fonction.

5 Bibliographie

(Al-Qusairi et al., 2011). T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. Skeletal Muscle **1**:26.

(Al-Qusairi et al, 2009). T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. **106**:18763-18768.

(Ambler, Neave et Singer, 1984). X-linked recessive myotubular myopathy: ii. muscle morphology and human myogenesis. Human Pathology **15**:1107-1120.

(Ambler, Neave et al., 1984). X-linked recessive myotubular myopathy: i. clinical and pathologic findings in a family.. Human Pathology **15**:566-574.

(Ampong et al., 2005). Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor.. Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases **24**:134-144.

(Andronache et al., 2007). The auxiliary subunit g1 of the skeletal muscle l-type ca2+ channel is an endogenous ca2+ antagonist. Proceedings of the National Academy of Sciences **104**:17885-17890.

(Arruda et al., 2001). Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor ix. Blood **97**:130-138.

(Askanas et al., 1979). X-linked recessive congenital muscle fiber hypotrophy with central nuclei: abnormalities of growth and adenylate cyclase in muscle tissue cultures. Archives of Neurology **36**:604-609.

(Azzedine et al., 2003). Mutations in mtmr13, a new pseudophosphatase homologue of mtmr2 and sbf1, in two families with an autosomal recessive demyelinating form of charcot-marie-tooth disease associated with early-onset glaucoma. American journal of human genetics **72**:1141-1153.

(Barth et al., 1998). X-linked myotubular myopathy--a long-term follow-up study.. European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society **2**:49-56.

(Barth et al., 1975). X-linked myotubular myopathy with fatal neonatal asphyxia. Neurology **25**:531-536.

(Baulac et al., 2008). A novel locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus in french families. Archives of Neurology **65**:943-951.

(Beggs et al., 2010). Mtm1 mutation associated with x-linked myotubular myopathy in labrador retrievers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**:14697-14702.

(Begley et al., 2005). The structure and regulation of myotubularin phosphatases. Current Opinion in Structural Biology **15**:614 - 620.

(Begley et al., 2006). Molecular basis for substrate recognition by mtmr2, a myotubularin family phosphoinositide phosphatase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**:927-932.

(Begley et al., 2003). Crystal structure of a phosphoinositide phosphatase, mtmr2: insights into myotubular myopathy and charcot-marie-tooth syndrome. Molecular cell **12**:1391-1402.

(Berger et al., 2006). Multi-level regulation of myotubularin-related protein-2 phosphatase activity by myotubularin-related protein-13/set-binding factor-2. Human Molecular Genetics **15**:569-579.

(Berger et al., 2011). The cmt4b disease-causing proteins mtmr2 and mtmr13/sbf2 regulate akt signalling. Journal of Cellular and Molecular Medicine **15**:307-315.

(Berger et al., 2002). Loss of phosphatase activity in myotubularin-related protein 2 is associated with charcot-marie-tooth disease type 4b1. Human Molecular Genetics **11**:1569-1579.

(Bevilacqua et al., 2009). "necklace" fibers, a new histological marker of late-onset mtm1-related centronuclear myopathy. Acta Neuropathologica **117**:283-291.

(Biancalana et al., 2003). Characterisation of mutations in 77 patients with x-linked myotubular myopathy, including a family with a very mild phenotype. Human Genetics **112**:135-142.

(Bièche et al., 1998). Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. International Journal

of Cancer **78**:661-666.

(Blondeau et al., 2000). Myotubularin, a phosphatase deficient in myotubular myopathy, acts on phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 3-phosphate pathway. Human molecular genetics **9**:2223-2229.

(Bolino et al., 2004). Disruption of mtmr2 produces cmt4b1-like neuropathy with myelin outfolding and impaired spermatogenesis. The Journal of Cell Biology **167**:711-721.

(Bolino et al., 2000). Charcot-marie-tooth type 4b is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. Nature Genetics **25**:17-19.

(Bolis et al., 2009). Dlg1, sec8, and mtmr2 regulate membrane homeostasis in schwann cell myelination. The Journal of Neuroscience **29**:8858-8870.

(Bolis et al., 2005). Loss of mtmr2 phosphatase in schwann cells but not in motor neurons causes charcot-marie-tooth type 4b1 neuropathy with myelin outfoldings. The Journal of Neuroscience **25**:8567-8577.

(Bonneick et al., 2005). An animal model for charcot-marie-tooth disease type 4b1. Human Molecular Genetics **14**:3685-3695.

(Bradford, 1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.. Analytical biochemistry **7**:248-254.

(Braga et al., 1990). Severe neonatal asphyxia due to x-linked centronuclear myopathy. Europeans Journal of Pediatry **150(2)**:132-135.

(Brockstedt et al., 1999). Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration. Clinical Immunology **92**:67 - 75.

(Bryson-Richardson et al., 2008). The genetics of vertebrate myogenesis. Nature Reviews Genetics **9**:632-646.

(Bucher et al., 1986). Severe neonatal centronuclear (myotubular) myopathy: an x-linked recessive disorder. Helv Paediatr Acta **41(4)**:291-300.

(Buj-Bello, Furling at al., 2002). Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1

gene is impaired in dm1 muscle cells. Human Molecular Genetics **11**:2297-2307.

(Buj-Bello et al., 2008). Aav-mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis. Human molecular genetics **17**:2132-2143.

(Buj-Bello et al., 2002). The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**:15060-15065.

(Cao et al., 2007). Myotubularin lipid phosphatase binds the hvps15/hvps34 lipid kinase complex on endosomes. Traffic **8**:1052-1067.

(Cao et al., 2008). Sequential actions of myotubularin lipid phosphatases regulate endosomal pi(3)p and growth factor receptor trafficking. Molecular biology of the cell **19**:3334-3346.

(Carlson et al., 1990). A noninvasive procedure to detect muscle weakness in the mdx mouse.. Muscle Nerve **13**:480-484.

(Chaussade et al., 2003). Expression of myotubularin by an adenoviral vector demonstrates its function as a phosphatidylinositol 3-phosphate [ptdins(3)p] phosphatase in muscle cell lines: involvement of ptdins(3)p in insulin-stimulated glucose transport. Molecular endocrinology (Baltimore, Md.) **17**:2448-2460.

(Chen et al., 2010). Prenatal diagnosis of x-linked myotubular myopathy. Prenatal Diagnosis **30**:177-179.

(Clague et al., 2005). The myotubularin family of lipid phosphatases. Traffic **6**:1063-1069.

(Close, 1972). Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. Physiological Reviews **52**:129-197.

(Coërs et al., 1976). Changes in motor innervation and histochemical pattern of muscle fibers in some congenital myopathies. Neurology **26**:1046-1053.

(Costa et al., 2004). Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. Brazilian Journal of Medical and Biological Research **37**:1819 -

1830.

(Cui et al., 1998). Association of set domain and myotubularin-related proteins modulates growth control. Nature Genetics **18**:331-337.

(Dang et al., 2004). Disease-related myotubularins function in endocytic traffic in caenorhabditis elegans. Molecular Biology of the Cell **15**:189-196.

(de Goede et al., 2005). Muscle biopsy without centrally located nuclei in a male child with mild x-linked myotubular myopathy. Developmental Medicine & Child Neurology **47**:835-837.

(de Gouyon et al., 1997). Characterization of mutations in the myotubularin gene in twenty six patients with x-linked myotubular myopathy. Human Molecular Genetics **6**:1499-1504.

(De Matteis et al., 2004). Pi-loting membrane traffic. Nature cell biology **6**:487-492.

(Denu et al., 1996). Form and function in protein dephosphorylation. Cell **87**:361–364.

(Di Paolo et al., 2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. Nature **443**:651-657.

(Ding et al., 2009). The arabidopsis chromatin modifier atx1, the myotubularin-like atmtm and the response to drought.. Plant Signaling and behavior **4**:1049-1058.

(Donders et al., 1986). X-linked centronuclear myopathy as a cause of floppy baby. :.

(Dorchies et al., 2001). Normal innervation and differentiation of x-linked myotubular myopathy muscle cells in a nerve-muscle coculture system. Neuromuscular Disorders **11**:736-746.

(Dowling et al., 2009). Loss of myotubularin function results in t-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. Plos Genetics **5**:e1000372.

(Dowling et al., 2010). Zebrafish mtmr14 is required for excitation-contraction coupling, developmental motor function and the regulation of autophagy. Human Molecular Genetics **19**:2668-2681.

(Dulhunty, 2006). Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **33**:763-772.

(Emans et al., 1993). Annexin ii is a major component of fusogenic endosomal vesicles.. The Journal of Cell Biology **120**:1357-1369.

(Fidziańska et al., 1994). Aberrant arrested in maturation neuromuscular junctions in centronuclear myopathy.. Journal of the neurological sciences **124**:83-88.

(Fields et al., 2000). Role of vector in activation of t cell subsets in immune responses against the secreted transgene product factor ix. Mol Ther **1**:225-235.

(Firestein et al., 2001). Pseudo-phosphatase sbf1 contains an n-terminal gef homology domain that modulates its growth regulatory properties. Journal of Cell Science **114**:2921-2927.

(Flex et al., 2002). Rapid scanning of myotubularin (mtm1) gene by denaturing high-performance liquid chromatography (dhplc). Neuromuscular Disorders **12**:501-505.

(Flotte et al., 2005). Adeno-associated virus: a ubiquitous commensal of mammals. Human Gene Therapy **16**:401-407.

(Flucher et al., 2005). The role of auxiliary dihydropyridine receptor subunits in muscle. Journal of Muscle Research and Cell Motility **26**:1-6.

(Foster et al., 2008). Codon and mrna sequence optimization of microdystrophin transgenes improves expression and physiological outcome in dystrophic mdx mice following aav2/8 gene transfer. Mol Ther **16**:1825-1832.

(Fougerousse et al., 2007). Phenotypic correction of [alpha]-sarcoglycan deficiency by intra-arterial injection of a muscle-specific serotype 1 raav vector. Molecular Therapy **15**:53-61.

(Franklin et al., 2011). Endosomal targeting of the phosphoinositide 3-phosphatase mtmr2 is regulated by an n-terminal phosphorylation site. Journal of Biological Chemistry **286**:15841-15853.

(Franzini-Armstrong, 1991). Simultaneous maturation of transverse tubules and sarcoplasmic reticulum during muscle differentiation in the mouse. Developmental Biology **146**:353 - 363.

(Fujimura-Kiyono et al., 2008). Myotubular/centronuclear myopathy and central core disease. Neurology India **56**:325-332.

(Galibert et al., 2011). Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus

vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. Journal of Invertebrate Pathology **107, Supplement**:S80 - S93.

(Gayathri et al., 2000). Centronuclear myopathy--morphological relation to developing human skeletal muscle: a clinicopathological evaluation.. Neurology india **48**:19-28.

(Giorgi et al., 2009). Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **41**:1817 - 1827.

(Goh et al., 2011). Integrative analysis of array-comparative genomic hybridisation and matched gene expression profiling data reveals novel genes with prognostic significance in oesophageal adenocarcinoma. Gut **60**:1317-1326.

(Goryunov et al., 2008). Multiple disease-linked myotubularin mutations cause nfl assembly defects in cultured cells and disrupt myotubularin dimerization. Journal of Neurochemistry **104**:1536-1552.

(Grogan et al., 2005). Myopathy with skeletal asymmetry and hemidiaphragm elevation is caused by myotubularin mutations.. Neurology **64**:1638-1640.

(Gundersen, 2011). Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. Biological Reviews **86**:564-600.

(Haase, 2007). Ahnak, a new player in b-adrenergic regulation of the cardiac l-type ca2+ channel. Cardiovascular Research **73**:19-25.

(Hagstrom et al., 2000). Improved muscle-derived expression of human coagulation factor ix from a skeletal actin/cmv hybrid enhancer/promoter. Blood **95**:2536-2542.

(Hammans et al., 2000). A clinical and genetic study of a manifesting heterozygote with x-linked myotubular myopathy. Neuromuscul Disorders **10**:133-137.

(Hellemans et al., 2007). Qbase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative pcr data. Genome Biology **8**:R19.

(Helliwell et al., 1998). Myotubular myopathy: morphological, immunohistochemical and clinical

variation.. Neuromuscular disorders **8**:152-161.

(Herman et al., 2002). Characterization of mutations in fifty north american patients with x-linked myotubular myopathy. Human Mutation **19**:114-121.

(Herman et al., 1999). Medical complications in long-term survivors with x-linked myotubular myopathy. The Journal of Pediatrics **134(2)**:206-214.

(Herzog et al., 1999). Long-term correction of canine hemophilia b by gene transfer of blood coagulation factor ix mediated by adeno-associated viral vector. Nat Med **5**:56-63.

(Herzog et al., 1997). Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor ix after intramuscular injection of recombinant adeno-associated-virus. Proceedings of the National Academy of Sciences **94**:5804-5809.

(Herzog et al., 2002). Influence of vector dose on factor ix-specific t and b cell responses in muscle-directed gene therapy.. Human gene therapy **13**:1281-1291.

(Hnia et al., 2011). Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. The Journal of Clinical Investigation **121**:70-85.

(Hoffjan et al., 2006). Extreme phenotypic variability in a german family with x-linked myotubular myopathy associated with e404k mutation in mtm1. Neuromuscular Disorders **16**:749–753.

(Hotta et al., 2011). Association of variations in the fto, scg3 and mtmr9 genes with metabolic syndrome in a japanese population. J Hum Genet **56**:647-651.

(Hu, Laporte, Kioschis et al., 1996). X-linked myotubular myopathy: refinement of the gene to a 280-kb region with new and highly informative microsatellite markers.. Human Genetics **98**:178-181.

(Hu, Laporte, Kress et al., 1996). Deletions in xq28 in two boys with myotubular myopathy and abnormal genital development define a new contiguous gene syndrome in a 430 kb region. Human Molecular Genetics **5**:139-143.

(Huang et al., 2007). Ahnak, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to

the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. The FASEB Journal **21**:732-742.

(Jørgensen et al., 2009). Efficient and fast functional screening of microdystrophin constructs in vivo and in vitro for therapy of duchenne muscular dystrophy.. Human gene therapy **20**:641-650.

(Jost et al., 1997). Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: ca2+ is not required for the association of annexin ii with early endosomes. Journal of Cell Science **110**:221-228.

(Jungbluth et al., 2003). Early and severe presentation of x-linked myotubular myopathy in a girl with skewed x-inactivation. Neuromuscular disorders **13**:55-59.

(Jungbluth et al., 2007). Centronuclear myopathy due to a de novo dominant mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor (ryr1) gene. Neuromuscular Disorders **17**:338-345.

(Kandaveloun et al., 2009). Targeted manipulation of mammalian genomes using designed zinc finger nucleases. Biochemical and Biophysical Research Communications **388**:56 - 61.

(Kao et al., 2010). Fix-triple, a gain-of-function factor ix variant, improves haemostasis in mouse models without increased risk of thrombosis.. Thrombosis and haemostasis **104**:355-365.

(Karger et al., 2005). Fatal hepatic haemorrhage in a child—peliosis hepatis versus maltreatment. Int J Legal Med **119**:44–46.

(Kay et al., 2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. Nature Medecine **7**:33-40.

(Kelley et al., 2004). Modulation of cellular phosphatidylinositol 3-phosphate levels in primary macrophages affects heat-killed but not viable mycobacterium avium's transport through the phagosome maturation process. Cellular Microbiology **6**:973-985.

(Keppen et al., 1987). X-linked myotubular myopathy: intrafamilial variability and normal muscle biopsy in a heterozygous female.. Clinical genetics **32**:95-99.

(Kerk et al., 2010). A phylogenetic survey of myotubularin genes of eukaryotes: distribution, protein structure, evolution, and gene expression.. BMC evolutionary biology **10**:196.

(Kim et al., 2003). Regulation of myotubularin-related (mtmr)2 phosphatidylinositol phosphatase

by mtmr5, a catalytically inactive phosphatase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**:4492-4497.

(Klinge et al., 2010). Dysferlin associates with the developing t-tubule system in rodent and human skeletal muscle. Muscle & Nerve **41**:166-173.

(Klinge et al., 2007). From t-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis. The FASEB Journal **21**:1768-1776.

(Koo et al., 2011). Delivery of aav2/9-microdystrophin genes incorporating helix 1 of the coiled-coil motif in the c-terminal domain of dystrophin improves muscle pathology and restores the level of α1-syntrophin and α-dystrobrevin in skeletal muscles of mdx mice.. Human gene therapy **22**:1379-1388.

(Kristiansen et al., 2003). X-inactivation patterns in carriers of x-linked myotubular myopathy. Neuromuscul Disorders **13**:468-471.

(Lai et al., 1999). Skeletal muscle-specific expression of human blood coagulation factor ix rescues factor ix deficiency mouse by aav-mediated gene transfer.. Science in China. Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences **42**:628-34..

(Lapidos et al., 2004). The dystrophin glycoprotein complex. Circulation Research **94**:1023-1031.

(Laporte, Guiraud-Chaumeil et al., 1998). Genomic organization of the mtm1 gene implicated in x-linked myotubular myopathy.. European journal of human genetics : EJHG **6**:325-230.

(Laporte et al., 2003). Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases. Human Molecular Genetics **12**:R285-R292.

(Laporte, Blondeau et al., 1998). Characterization of the myotubularin dual specificity phosphatase gene family from yeast to human. Human Molecular Genetics **7**:1703-1712.

(Laporte et al., 1996). A gene mutated in x-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. Nature genetics **13**:175-182.

(Laporte et al., 2000). Mtm1 mutations in x-linked myotubular myopathy. Human Mutation **15**:393-409.

(Laporte et al., 2001). Diagnosis of x-linked myotubular myopathy by detection of myotubularin.. Annals of neurology **50**:42-46.

(Lawlor et al., 2011). Inhibition of activin receptor type iib increases strength and lifespan in myotubularin-deficient mice. The American Journal of Pathology **178**:784 - 793.

(Leberer et al., 1990). Purification, calcium binding properties, and ultrastructural localization of the 53,000- and 160,000 (sarcalumenin)-dalton glycoproteins of the sarcoplasmic reticulum.. Journal of Biological Chemistry **265**:10118-10124.

(Lebiedzinska et al., 2009). Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **41**:1805 - 1816.

(Lennon et al., 2003). Dysferlin interacts with annexins a1 and a2 and mediates sarcolemmal wound-healing. Journal of Biological Chemistry **278**:50466-50473.

(Li et al., 1989). Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development.. Gene **78**:243-254.

(Li et al., 1991). High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer.. Journal of Biological Chemistry **266**:6562-6570.

(Li et al., 1993). Different factors interact with myoblast-specific and myotube-specific enhancer regions of the human desmin gene.. Journal of Biological Chemistry **268**:10403-10415.

(Liu et al., 2004). Therapeutic levels of factor ix expression using a muscle-specific promoter and adeno-associated virus serotype 1 vector.. Human gene therapy **15**:783-792.

(Lorenzo et al., 2005). Analysis of phosphoinositide binding domain properties within the myotubularin-related protein mtmr3. Journal of cell science **118**:2005-2012.

(Lorenzo et al., 2006). Systematic analysis of myotubularins: heteromeric interactions, subcellular localisation and endosomerelated functions. Journal of Cell Science **119**:2953-2959.

(Lostal et al., 2010). Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. Human Molecular Genetics **19**:1897-1907.

(Lu, 2004). Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy-a review. Stem Cells and Development **13**:133-145.

(Luther, 2009). The vertebrate muscle z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. J Muscle Res Cell Motil **30**:171–185.

(Ma et al., 2008). Characterization and functional studies of a fyve domain-containing phosphatase in c. elegans. Journal of Cellular Biochemistry **104**:1843-1852.

(Manno et al., 2006). Successful transduction of liver in hemophilia by aav-factor ix and limitations imposed by the host immune response. Nat Med **12**:342-347.

(Mayran et al., 2003). Annexin ii regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. EMBO Journal **22**:3242-3253.

(McCaffrey et al., 2008). The host response to adenovirus, helper-dependent adenovirus, and adeno-associated virus in mouse liver. Molecular Therapy **16**:931-941.

(McEntagart et al., 2002). Genotype–phenotype correlations in x-linked myotubular myopathy. Neuromuscular Disorders **12**:939-946.

(Mei et al., 2009). Cooperation of mtmr8 with pi3k regulates actin filament modeling and muscle development in zebrafish.. PloS one **4**:e4979.

(Mingozzi et al., 2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using aav: progress and challenges. Nat Rev Genet **12**:341-355.

(Mingozzi et al., 2009). Aav-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific t cells. Blood **114**:2077-2086.

(Mingozzi et al., 2002). Improved hepatic gene transfer by using an adeno-associated virus serotype 5 vector. Journal of Virology **76**:10497-10502.

(Mingozzi et al., 2003). Induction of immune tolerance to coagulation factor ix antigen by in vivo hepatic gene transfer. The Journal of Clinical Investigation **111**:1347-1356.

(Mochizuki et al., 2003). Characterization of myotubularin-related protein 7 and its binding partner, myotubularin-related protein 9. Proceedings of the National Academy of Sciences of the

United States of America **100**:9768-9773.

(Morel et al., 2009). Annexin a2 binding to endosomes and functions in endosomal transport are regulated by tyrosine 23 phosphorylation. Journal of Biological Chemistry **284**:1604-1611.

(Morel et al., 2007). The p11/s100a10 light chain of annexin a2 is dispensable for annexin a2 association to endosomes and functions in endosomal transport. PLoS ONE **2**:e1118.

(Mruk et al., 2010). The myotubularin family of lipid phosphatases in disease and in spermatogenesis. Biochemical Journal **433**:253-262.

(Mueller et al., 2008). Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. Gene Therapy **15**:858-863.

(Musatov et al., 2002). A cis-acting element that directs circular adeno-associated virus replication and packaging. Journal of Virology **76**:12792-12802.

(Nandurkar et al., 2001). Characterization of an adapter subunit to a phosphatidylinositol (3)p 3-phosphatase: identification of a myotubularin-related protein lacking catalytic activity. Proceedings of the National Academy of Sciences **98**:9499-9504.

(Nandurkar et al., 2003). Identification of myotubularin as the lipid phosphatase catalytic subunit associated with the 3-phosphatase adapter protein, 3-pap. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**:8660-8665.

(Nathwani et al., 2011). Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary aav vector encoding human fix pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. Molecular Therapy **19**:876-885.

(Naughtin et al., 2010). The myotubularin phosphatase mtmr4 regulates sorting from early endosomes. Journal of Cell Science **123**:3071-3083.

(Ndamukong et al., 2010). Phosphatidylinositol 5-phosphate links dehydration stress to the activity of arabidopsis trithorax-like factor atx1. PLoS ONE **5**:e13396.

(Neukomm et al., 2011). The phosphoinositide phosphatase mtm-1 regulates apoptotic cell corpse clearance through ced-5â ced-12 in c. elegans. Development **138**:2003-2014.

Nishino et al., 1998. **Nishino, I., N. Minami, O. Kobayashi, M. Ikezawa, Y. Goto, K. Arahata, and I. Nonaka**. 1998. Mtm1 gene mutations in japanese patients with the severe infantile form of myotubular myopathy. Neuromuscular Disorders **8**:453-458.

(Nolan et al., 2006). Quantification of mrna using real-time rt-pcr. Nature Protocols **1**:1559-1582.

(Oldfors et al., 1989). X-linked myotubular myopathy: clinical and pathological findings in a family. :.

(Parrish et al., 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. Molecular Biology of the Cell **15**:3567-3579.

(Pénisson-Besnier et al., 2007). Diagnosis of myotubular myopathy in the oldest known manifesting female carrier: a clinical and genetic study. Neuromuscular Disorders **17**:180-185.

(Pfaffl, 2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr.. Nucleic acids research **29**:e45..

(Pierson et al., 2012). Modeling the human mtm1 p.r69c mutation in murine mtm1 results in exon 4 skipping and a less severe myotubular myopathy phenotype. Human Molecular Genetics **21**:811-825.

(Pierson et al., 2007). Myofiber size correlates with mtm1 mutation type and outcome in x-linked myotubular myopathy. Neuromuscular disorders **17**:562-568.

(Plant et al., 2009). The inositol phosphatase mtmr4 is a novel target of the ubiquitin ligase nedd4. Biochem J **419**:57-63.

(Previtali et al., 2003). Myotubularin-related 2 protein phosphatase and neurofilament light chain protein, both mutated in cmt neuropathies, interact in peripheral nerve. Human Molecular Genetics **12**:1713-1723.

(Razidlo et al., 2011). Myotubularin regulates akt-dependent survival signaling via phosphatidylinositol 3-phosphate. Journal of Biological Chemistry **286**:20005-20019.

(Ribeiro et al., 2011). Phosphoinositide regulation of integrin trafficking required for muscle

attachment and maintenance. PLoS Genet **7**:e1001295.

(Ritter et al., 2012). Mutation screening of pdzd2, golph3, and mtmr12 genes in patients with schizophrenia. Psychiatric Genetics **22**:51-52.

(Riviere et al., 2006). Long-term expression and repeated administration of aav type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. Gene therapy **13**:1300-1308.

(Robb et al., 2011). Impaired neuromuscular transmission and response to acetylcholinesterase inhibitors in centronuclear myopathies. Neuromuscular Disorders **21**:379-386.

(Robinson et al., 2005). The phosphoinositide-3-phosphatase mtmr2 associates with mtmr13, a membrane-associated pseudophosphatase also mutated in type 4b charcot-marie-tooth disease. The Journal of biological chemistry **280**:31699-31707.

(Rohr et al., 2002). Fast and reliable titration of recombinant adeno-associated virus type-2 using quantitative real-time pcr. Journal of Virological Methods **106**:81 - 88.

(Romero-Suarez et al., 2010). Muscle-specific inositide phosphatase (mip/mtmr14) is reduced with age and its loss accelerates skeletal muscle aging process by altering calcium homeostasis.. Aging **2**:504-513.

(Romero, 2010). Centronuclear myopathies: a widening concept. Neuromuscular disorders : NMD **20**:223-228.

(Ross et al., 2007). Differential redox regulation within the ptp superfamily. Cellular Signalling **19**:1521 - 1530.

(Santoro et al., 2010). Analysis of mtmr1 expression and correlation with muscle pathological features in juvenile/adult onset myotonic dystrophy type 1 (dm1) and in myotonic dystrophy type 2 (dm2). Experimental and Molecular Pathology **89**:158 - 168.

(Sarnat, 1990). Myotubular myopathy: arrest of morphogenesis of myofibres associated with persistence of fetal vimentin and desmin. four cases compared with fetal and neonatal muscle.. The Canadian journal of neurological sciences **17**:109-123.

(Sarnat et al., 1981). Neonatal myotubular myopathy: neuropathy and failure of postnatal

maturation of fetal muscle.. The Canadian journal of neurological sciences **8**:313-320.

(Sasaki et al., 2009). Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. Progress in Lipid Research **48**:307 - 343.

(Schaletzky et al., 2003). Phosphatidylinositol-5-phosphate activation and conserved substrate specificity of the myotubularin phosphatidylinositol 3-phosphatases. Current biology : CB **13**:504-509.

(Schara et al., 2003). X-linked myotubular myopathy in a female infant caused by a new mtm1 gene mutation.. Neurology **22**:1363-1365.

(Schuettrumpf et al., 2005). Factor ix variants improve gene therapy efficacy for hemophilia b. Blood **105**:2316-2323.

(Schultz et al., 2008). Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. Mol Ther **16**:1189-1199.

(Senderek et al., 2003). Mutation of the sbf2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in charcot-marie-tooth neuropathy type 4b2/11p15. Human Molecular Genetics **12**:349-356.

(Shen et al., 2009). Deficiency of mip/mtmr14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting ca2+ homeostasis. Nat Cell Biol **11**:769-776.

(Silhankova et al., 2010). Wnt signalling requires mtm-6 and mtm-9 myotubularin lipid-phosphatase function in wnt-producing cells. EMBO Journal **29**:4094-4105.

(Silver et al., 1986). Morphologic and morphometric analysis of muscle in x-linked myotubular myopathy.. Human Pathology **17**:1167-1178.

(Sipos et al., 2000). Effects of the dihydropyridine receptor subunits gamma and alpha2delta on the kinetics of heterologously expressed l-type ca2+ channels.. Pflügers Archiv : European journal of physiology **439**:691-699.

(Smets, 2008). X-linked myotubular myopathy and chylothorax. Neuromuscular Disorders **18**:183 - 184.

(Smith, 2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. Gene Therapy **15**:817-822.

(Smolenicka et al., 1996). X-linked myotubular myopathy: refinement of the critical gene region. Neuromuscular Disorders **6**:275 - 281.

(Sonntag et al., 2010). A viral assembly factor promotes aav2 capsid formation in the nucleolus. Proceedings of the National Academy of Sciences **107**:10220-10225.

(Spiro et al., 1966). Myotubular myopathy: persistence of fetal muscle in an adolescent boy. Archives in Neurology **14**:1-13.

(Srivastava et al., 2006). Phosphatidylinositol 3-phosphate indirectly activates kca3.1 via 14 amino acids in the carboxy terminus of kca3.1. Molecular Biology of the Cell **17**:146-154.

(Srivastava et al., 2005). The phosphatidylinositol 3-phosphate phosphatase myotubularin- related protein 6 (mtmr6) is a negative regulator of the ca2+-activated k+ channel kca3.1. Molecular and Cellular Biology **25**:3630-3638.

(Starr et al., 1990). A linkage study of a large pedigree with x linked centronuclear myopathy.. Journal of medical genetics **27**:281-283.

(Sustersic et al., 2005). Letter to the editor : 'long-term survivor with x-linked myotubular myopathy'.. Developmental Medicine & Child Neurology **47**:358-359.

(Sutton et al., 2001). Limb girdle and facial weakness in female carriers of x-linked myotubular myopathy mutations.. Neurology **57**:900-902.

(Taguchi-Atarashi et al., 2010). Modulation of local ptdins3p levels by the pi phosphatase mtmr3 regulates constitutive autophagy. Traffic **11**:468-478.

(Takekura et al., 2001). Sequential docking, molecular differentiation, and positioning of t-tubule/sr junctions in developing mouse skeletal muscle. Developmental Biology **239**:204 - 214.

(Tanner, 0rstavik et al., 1999). Skewed x-inactivation in a manifesting carrier of x-linked myotubular myopathy and in her non-manifesting carrier mother. Human Genetics **104**:249-253.

(Tanner, Schneider et al., 1999). Characterization of 34 novel and six known mtm1 gene mutations in 47 unrelated x-linked myotubular myopathy patients. Neuromuscul Disorders **9**:41-49.

(Taylor et al., 2000). Inaugural article: myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in

myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**:8910-8915.

(Tosch et al., 2006). A novel ptdins3p and ptdins(3,5)p2 phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy. Human Molecular Genetics **15**:3098-3106.

(Tosch et al., 2010). Novel molecular diagnostic approaches for x-linked centronuclear (myotubular) myopathy reveal intronic mutations. Neuromuscular Disorders **20**:375-381.

(Tronchère et al., 2004). Production of phosphatidylinositol 5-phosphate by the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin in mammalian cells. Journal of Biological Chemistry **279**:7304-7312.

(Tsai et al., 2005). Characterization of mtm1 mutations in 31 japanese families with myotubular myopathy, including a patient carrying 240kb deletion in xq28 without male hypogenitalism. Neuromuscular Disorders **15**:245-252.

(Tsujita et al., 2004). Myotubularin regulates the function of the late endosome through the gram domain-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate interaction. The Journal of biological chemistry **279**:13817-13824.

(Ursu et al., 2004). Altered inactivation of ca2+ current and ca2+ release in mouse muscle fibers deficient in the dhp receptor ĩ³1 subunit. The Journal of General Physiology **124**:605-618.

(Van Wijngaarden et al., 1969). Familial “myotubular” myopathy. Neurology **19**:901-908.

(Vandenburgh et al., 2008). Drug-screening platform based on the contractility of tissue-engineered muscle. Muscle & Nerve **37**:438-447.

(Vanhaesebroeck et al., 2010). The emerging mechanisms of isoform-specific pi3k signalling.. Nature reviews. Molecular cell biology **11**:329-341.

(Vasileva et al., 2005). Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting. Nature Reviews Microbiology **3**:837-847.

(Velichkova et al., 2010). Drosophila mtm and class ii pi3k coregulate a pi(3)p pool with cortical and endolysosomal functions. The Journal of Cell Biology **190**:407-425.

(Van Der Ven et al., 1995). Abnormal expression of intermediate filament proteins in x-linked myotubular myopathy is not reproduced in vitro. Neuromuscular Disorders **5**:267 - 275.

(Vergne et al., 2009). Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase jumpy. EMBO Journal **28**:2244-2258.

(Walker et al., 2001). Characterization of mtmr3: an inositol lipid 3-phosphatase with novel substrate specificity. Current biology : CB **11**:1600-1605.

(Wallgren-Pettersson et al., 1995). The myotubular myopathies: differential diagnosis of the x linked recessive, autosomal dominant, and autosomal recessive forms and present state of dna studies. Journal of Medical Genetics **32**:673-679.

(Wilmshurst et al., 2010). Ryr1 mutations are a common cause of congenital myopathies with central nuclei. Annals of Neurology **68**:717-726.

(Wishart et al., 2001). Pten and myotubularin phosphoinositide phosphatases: bringing bioinformatics to the lab bench.. Current opinion in cell biology **13**:172-181.

(Wu et al., 2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. Molecular Therapy **14**:316-327.

(Xiao et al., 1996). Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector.. Journal of Virology **70**:8098-8108.

(Xiao et al., 1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. Journal of Virology **72**:2224-2232.

(Xu et al., 2007). Immune response after neonatal transfer of a human factor ix-expressing retroviral vector in dogs, cats, and mice. Thrombosis Research **120**:269-280.

(Xue et al., 2003). Genetic analysis of the myotubularin family of phosphatases in caenorhabditis elegans. Journal of Biological Chemistry **278**:34380-34386.

(Yanagiya et al., 2007). Association of single-nucleotide polymorphisms in mtmr9 gene with obesity. Human Molecular Genetics **16**:3017-3026.

(Yoshida et al., 2005). Impaired ca2+ store functions in skeletal and cardiac muscle cells from

sarcalumenin-deficient mice. Journal of Biological Chemistry **280**:3500-3506.

(Yoshimura et al., 2004). Aav vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. Mol Ther **10**:821-828.

(Yu et al., 2010). Mtmr4 attenuates transforming growth factor b (tgfb) signaling by dephosphorylating r-smads in endosomes. Journal of Biological Chemistry **285**:8454-8462.

(Yue et al., 2008). A single intravenous injection of adeno-associated virus serotype-9 leads to whole body skeletal muscle transduction in dogs. Mol Ther **16**:1944-1952.

(Zhang et al., 2001). Recombinant adenovirus expressing adeno-associated virus cap and rep proteins supports production of high-titer recombinant adeno-associated virus. Gene Therapy **8**:704–712.

(Zhao et al., 2000). Fyve-dsp1, a dual-specificity protein phosphatase containing an fyve domain. Biochemical and Biophysical Research Communications **270**:222 - 229.

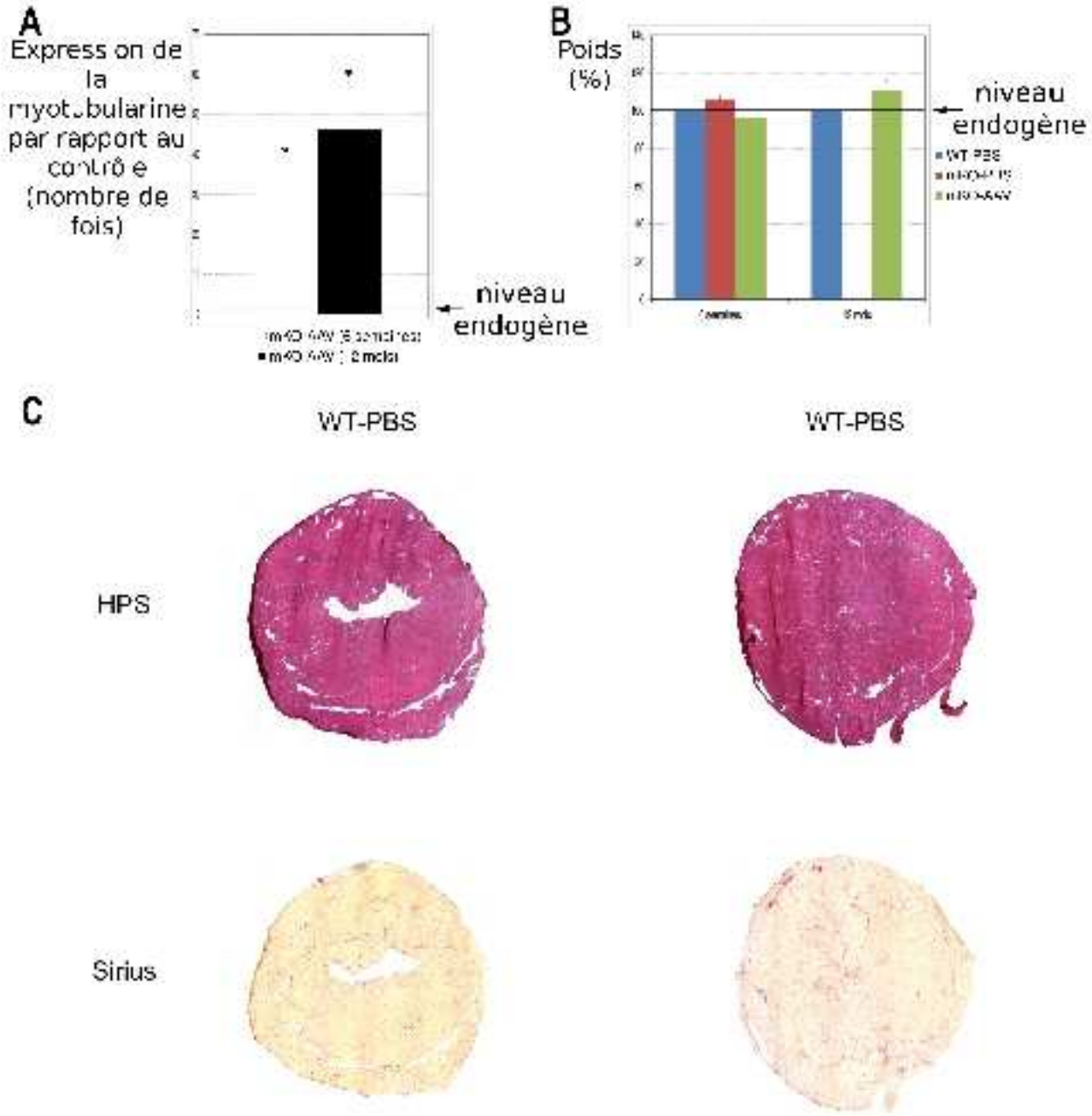
(Zhao et al., 2001). Fyve-dsp2, a fyve domain-containing dual specificity protein phosphatase that dephosphorylates phosphotidylinositol 3-phosphate. Experimental Cell Research **265**:329 - 338.

(Zincarelli et al., 2008). Analysis of aav serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy **16**:1073-1080.

(Zou et al., 2009). Mtmr9 increases mtmr6 enzyme activity, stability, and role in apoptosis. Journal of Biological Chemistry **284**:2064-2071.

(Zou, Lu et al., 2009). Caenorhabditis elegans myotubularin mtm-1 negatively regulates the engulfment of apoptotic cells. PLoS Genet **5**:e1000679.

6 Annexes


A
Express on de la myot.bularine par rapport au contrô e (nombre de fois)
niveau endogène
B
Poids (%)
niveau endogène
C
WT-PBS
WT-PBS
HPS
Sirius

Annexe 1 : expression du transgène dans le cœur et effet sur l'histologie dans le mutant mKO 12 mois après l'injection du nouveau vecteur thérapeutique AAV9-DES-MTM1.

A/ Le niveau d'expression de la myotubularine est obtenu après une première normalisation par le niveau de GAPDH dans chaque échantillon puis le rapport est exprimé en fonction du muscle contrôle. Il montre que le transgène est sur exprimé par rapport à l'endogène à 1,5 mois et augmente jusqu'à 12 mois. (1,5 mois : WT-PBS = 5 ; mKO-AAV = 6 ; 12 mois : WT-PBS = 3 ; mKO-AAV = 5) ; (* = P < 0,05). **B/** Le poids des cœurs est exprimé en pourcentage du muscle contrôle pour visualiser directement les variations, qui n'existent pas entre les différents muscles et selon les traitements. (1,5 mois : WT-PBS = 5 ; mKO-PBS = 2 ; mKO-AAV = 6 ; 12 mois : WT-PBS = 3 ; mKO-AAV = 5). **C/** Les coupes transversales de cœur colorées à l'hématoxyline-éosine-saphran (images du haut) et au rouge Sirius (images du bas) ne montre aucune lésion ni aucune plaque de collagène quel que soit le muscle à 12 mois après l'injections du vecteur (WT-PBS = 3 ; mKO-AAV = 5).

Annexe 2 : « Gene replacement therapy for myotubularin deficiency prolongs survival and restores muscle function in murine and canine models of X-linked myotubular myopathy ».

Thibaud JAMET

Approches thérapeutiques pour le traitement de la myopathie myotubulaire

Résumé

La myopathie myotubulaire (XLMTM, OMIM 310400) est causée par des mutations dans le gène *MTM*1 situé sur le chromosome X et apparaît à une fréquence de 1/50 000 naissances mâles. Les patients présentent une hypotonie et une faiblesse musculaire généralisées et de graves problèmes respiratoires à la naissance. En absence de traitement, les patients sont nombreux à décéder durant la première année de vie. Mon travail de thèse consiste à développer un traitement de thérapie génique pour la myopathie myotubulaire. L'injection intraveineuse du vecteur thérapeutique rAAV9-*DES*-*Mtm*1 chez le modèle murin de la myopathie myotubulaire permet d'obtenir de la protéine transgénique dans l'ensemble des muscles squelettiques de l'organisme. Un an après le traitement, les muscles malades retrouvent une morphologie normale et les souris sont en vie. La seconde partie porte sur l'évaluation des effets de la protéine MTMR2, un homologue de la myotubularine *(MTM1*), sur le muscle déficient en myotubularine, comme alternative à la thérapie génique avec *MTM*1. L'administration d'un vecteur AAV comportant le transgène MTMR2 dans le muscle malade améliore, partiellement, le phénotype musculaire. Ces résultats suggèrent que l'augmentation du niveau d'expression de MTMR2 dans le muscle malade pourrait être un traitement efficace. Enfin j'ai étudié le rôle de l'activité phosphatase de la myotubularine dans son action thérapeutique. J'ai comparé l'effet d'une forme inactive de myotubularine (MTM1C375S) à celui du transgène thérapeutique sur le muscle atteint de myopathie myotubulaire. Les résultats montrent que l'activité phosphatase de la myotubularine est nécessaire pour son activité thérapeutique.

Mots-clés : myopathie myotubulaire (OMIN 310400), gène *MTM1*, thérapie génique, traitement thérapeutique, virus associés aux adénovirus (AAV), modèle murin de la myopathie myotubulaire, *MTMR2*, activité phosphatase.

Résumé en anglais

Myotubular myopathy (XLMTM, OMIM 310400) is caused by mutations in the MTM1 gene located on the X chromosome and appeared at a frequency of 1/50 000 male births. Most of the patients are affected by hypotonia and generalized muscular weakness as well as grave respiratory problems in the birth. In absence of an effective therapeutic treatment they are many to die during the first year of their life. My thesis work consists in developing a treatment of gene therapy for myotubular myopathy. The intravenous injection of the therapeutic vector rAAV9-DES-MTM1 into the murin model of the myotubular myopathy allows transgenic protein in the whole skeletal muscle of the body. The therapeutic protein cures the muscular phenotype rapidly after injection. At one year after treatment, the thick muscles still be cured, mice are alive and recovered a normal development. Then, I estimated the effects of the protein MTMR2, a counterpart of the myotubularine (MTM1), on muscles from mice devoid of myotubularin, as alternative at the gene therapy with MTM1. The administration of a vector AAV containing the transgene MTMR2 in the thick muscles improves, partially, the muscular phenotype. These results suggest that the increase of MTMR2 protein level MTMR2 thick muscle could be an effective treatment. Finally, I studied the role of myotubularin phosphatase activity on its therapeutic action. I compared the effect of an inactive shape of myotubularin (MTM1C375S) on muscle affected by myotubular myopathy as the effect of therapeutic transgene on the same muscle. The results show that the phosphatase activity of the myotubularin is necessary for its therapeutic activity.

Key-words : myotubular myopathy (OMIN 310400), gene *MTM1*, gene therapy, therapeutic treatment, adeno-associated virus (AAV), murin model of myotubular myopathy, *MTMR2*, phosphatase activity.