



**HAL**  
open science

**Analyse des mécanismes cellulaires responsables de  
maladies neurodégénératives dans le modèle de la levure  
Saccharomyces cerevisiae : analyse fonctionnelle de  
myotubularines responsables de pathologies humaines**

Dimitri Bertazzi

► **To cite this version:**

Dimitri Bertazzi. Analyse des mécanismes cellulaires responsables de maladies neurodégénératives dans le modèle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* : analyse fonctionnelle de myotubularines responsables de pathologies humaines. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ069 . tel-01070634

**HAL Id: tel-01070634**

**<https://theses.hal.science/tel-01070634v1>**

Submitted on 2 Oct 2014

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé (ED414)**

**UMR7156**

**THÈSE** présentée par :

**Dimitri BERTAZZI**

soutenue le : **09 juillet 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**  
Discipline/ Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

« **Analyse des mécanismes cellulaires responsables de  
maladies neurodégénératives dans le modèle de la  
levure *Saccharomyces cerevisiae*** »

-

**Analyse fonctionnelle de myotubularines responsables de pathologies  
humaines**

**THÈSE dirigée par :**  
Mme FRIANT Sylvie

Docteur, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**  
M. DI RAGO Jean-Paul  
M. BLONDEL Marc

Professeur, université de Bordeaux Segalen  
Professeur, faculté de Médecine de Brest

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**  
M. MANDEL Jean-Louis (Président du jury)  
M. BITOUN Marc  
M. LAPORTE Jocelyn

Professeur, université de Strasbourg  
Docteur, Institut de Myologie, Paris  
Docteur, IGBMC, Illkirch



Je dédie cette thèse à  
mes parents Chantal et Roberto  
mon grand frère Adrien  
mon petit frère Clément

...

... bref, tous ceux qui n'ont jamais vraiment bien compris  
ce que j'ai fait pendant ces quatre dernières années.



## REMERCIEMENTS

Je commencerai par remercier ceux qui m'ont aidé au cours de mes travaux de thèse. Je pense notamment à Sylvie, évidemment, qui m'a encadré durant ces quatre années.

Je remercie l'Association Française contre les Myopathies (AFM) d'avoir soutenu financièrement mon projet pendant 3 ans.

Je remercie Jocelyn Laporte pour son aide précieuse et nos discussions très informatives.

Je remercie Leonela Amoasii pour sa disponibilité, son enthousiasme et son travail de qualité qui nous a permis de soumettre un article ensemble en tant que premiers co-auteurs (avec un nom de famille commençant par B, j'avais pourtant de bonnes chances d'être placé en premier parmi les co-auteurs ^\_^)

Je remercie Hélène Tronchère d'avoir accepté d'être régulièrement embêtée par mes envois d'échantillons et d'avoir contribué à mes résultats en réalisant les dosages lipidiques.

Je remercie Philippe Hammann de la plateforme protéomique de l'IMBC, pour son aide dans l'identification des protéines par spectrométrie de masse.

Je remercie Gilbert Eriani de m'avoir permis d'utiliser sa splendide machine à faire automatiquement des gradients de sucrose avec une grande reproductibilité (mais qui ne m'a finalement pas servie).

Je remercie Laurence Drouard et Michel Labouesse de m'avoir fait confiance et de m'avoir intégré dans l'équipe OpenLAB, promotion 2010-2011.

Je remercie toute la fourmillière du 4<sup>ème</sup> étage de l'IPCB (je ne cite personne, pas de jaloux).

Enfin, je vous remercie vous, lecteur anonyme ou membre de mon comité d'examen pour vos futures critiques à l'égard de mon travail.



## Liste des Abréviations

<b>xg</b>	x accélération de la pesanteur (= 9,81 m.s <sup>-2</sup> )
<b>ADN</b>	<u>A</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
<b>Amp</b>	<u>A</u> mpicilline
<b>BET</b>	<u>B</u> romure d' <u>E</u> thidium
<b>Cam</b>	<u>C</u> hlor <u>a</u> mphenicol
<b>D.O.<sub>xxx nm</sub></b>	<u>D</u> ensité <u>O</u> ptique <small>longueur d'onde xxx nm</small>
<b>ECL</b>	<u>E</u> nhanced <u>C</u> himio <u>L</u> uminescence
<b>EDTA</b>	<u>E</u> thylène- <u>d</u> iamine- <u>t</u> étraacétique <u>a</u> cid
<b>FYVEdomain</b>	( <u>F</u> ab1p, <u>Y</u> O1B, <u>V</u> ac1p and <u>E</u> EA1) domain
<b>GFP</b>	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
<b>GST</b>	<u>G</u> lutathion <u>S</u> epharose <u>T</u> ransferase
<b>HEPES</b>	N-[2- <u>H</u> ydroxy <u>E</u> thyl] <u>P</u> iperazine-N'-[2- <u>E</u> thane <u>S</u> ulfonic acid]
<b>MTM1</b>	<u>M</u> yo <u>T</u> ubular <u>M</u> yo <u>p</u> athy <u>1</u>
<b>MTMR</b>	<u>M</u> yo <u>T</u> ubular <u>M</u> yo <u>p</u> athy <u>R</u> elated
<b>HRP</b>	<u>H</u> orser <u>r</u> adish <u>P</u> eroxydase
<b>IPTG</b>	<u>I</u> sopropyl-1-B-D- <u>t</u> hio-1- <u>g</u> alactopyranoside
<b>kDa</b>	<u>k</u> ilo <u>D</u> alton
<b>LB</b>	<u>L</u> ysogeny- <u>B</u> roth
<b>LY</b>	<u>L</u> ucifer <u>Y</u> ellow
<b>MVB</b>	<u>M</u> ulti <u>V</u> esicular <u>B</u> ody, « Corps multivésiculaire »
<b>Pb</b>	<u>P</u> aires de <u>b</u> ases
<b>PC</b>	<u>P</u> hosphatidyl <u>C</u> holine
<b>PE</b>	<u>P</u> hosphatidyl <u>E</u> thanolamine
<b>PS</b>	<u>P</u> hosphatidyl <u>S</u> erine
<b>PDZ Binding Site</b>	<u>P</u> SD-95- <u>D</u> iscs-large- <u>Z</u> O1 Binding Site
<b>PEG 4000</b>	<u>P</u> oly <u>E</u> thylene <u>G</u> lycol
<b>PH-GRAM</b>	<u>P</u> leckstrin <u>H</u> omology- <u>G</u> lucosyltransferases, <u>R</u> ab-like, GTPases <u>A</u> ctivators and <u>M</u> ytubularins common domain
<b>PMSF</b>	<u>P</u> oly <u>M</u> ethyl- <u>S</u> ulfonyl- <u>F</u> luoride
<b>PIKfyve</b>	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol 5- <u>k</u> inase with <u>fyve</u> domain
<b>PtdIns</b>	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol
<b>PtdIns3P</b>	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol- <u>3</u> - <u>p</u> hosphate
<b>PtdIns(3,5)P<sub>2</sub></b>	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol- <u>3,5</u> - <u>b</u> iphosphate
<b>PtdIns5P</b>	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol- <u>5</u> - <u>p</u> hosphate
<b>PPI<sub>n</sub></b>	<u>P</u> oly <u>p</u> hospho <u>i</u> nositides
<b>RID</b>	<u>R</u> ac-1 <u>I</u> nduced localization to membrane ruffles <u>D</u> omain
<b>SBR</b>	<u>S</u> ample <u>B</u> uffer <u>R</u> educed
<b>SC-aa</b>	<u>S</u> ynthetic <u>C</u> omplete ; milieu de culture sans un ou plusieurs <u>a</u> cides <u>a</u> minés
<b>SD</b>	<u>S</u> ynthetic <u>D</u> extrose ; milieu de culture minimal sans acides aminés
<b>Sjl1/2/3</b>	<u>S</u> ynap <u>t</u> o <u>j</u> anin- <u>l</u> ike protein 1/2/3
<b>SDS</b>	<u>S</u> odium <u>D</u> odécyl <u>S</u> ulfate
<b>PAGE</b>	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
<b>rpm</b>	<u>r</u> otations <u>p</u> ar <u>m</u> inute
<b>SID</b>	<u>S</u> ET- <u>I</u> nteracting <u>D</u> omain
<b>SM</b>	<u>S</u> phingo <u>M</u> yéline
<b>TAE</b>	<u>T</u> ris base ; Acide <u>A</u> cetic ; <u>E</u> DTA
<b>Vph1</b>	<u>V</u> acuolar <u>p</u> H
<b>VPS</b>	<u>V</u> acuolar <u>P</u> rotein <u>S</u> orting
<b>WT</b>	<u>W</u> ild- <u>T</u> ype (sauvage)
<b>Ymr1</b>	<u>Y</u> east <u>m</u> ytubularin- <u>r</u> elated <u>P</u> rotein <u>1</u>
<b>YPD</b>	<u>Y</u> east extract/ <u>P</u> eptone/ <u>D</u> extrose



# TABLE DES MATIERES

❖	<b>PARTIE I : INTRODUCTION</b> .....	<b>- 1 -</b>
I.	LA LEVURE SACCHAROMYCES CEREVISIAE .....	- 1 -
A.	<i>Un peu d'histoire</i> .....	- 1 -
B.	<i>Généralités</i> .....	- 3 -
1.	<i>S. cerevisiae, un modèle d'étude très commode</i> .....	- 4 -
2.	<i>S. cerevisiae, un outil de génétique</i> .....	- 6 -
C.	<i>S. cerevisiae ... pas complètement différente des eucaryotes supérieurs</i> .....	- 8 -
D.	<i>Nomenclature des gènes et protéines</i> .....	- 14 -
1.	<i>Chez la levure</i> .....	- 14 -
2.	<i>Chez l'humain</i> .....	- 14 -
3.	<i>Chez la souris</i> .....	- 14 -
II.	MYOPATHIES ET SYNDROMES DE CHARCOT-MARIE-TOOTH .....	- 17 -
A.	<i>Une dénomination vaste</i> .....	- 17 -
1.	<i>Les myopathies</i> .....	- 18 -
2.	<i>Les syndromes de Charcot-Marie-Tooth</i> .....	- 19 -
3.	<i>Les gènes impliqués dans des maladies musculaires</i> .....	- 21 -
B.	<i>La myopathie centronucléaire liée au chromosome X (XLCNM)</i> .....	- 23 -
1.	<i>Le gène impliqué</i> .....	- 23 -
2.	<i>Les manifestations cliniques</i> .....	- 25 -
3.	<i>Les caractéristiques histologiques</i> .....	- 26 -
C.	<i>Le Syndrome de Charcot-Marie-Tooth type 4B (CMT4B)</i> .....	- 28 -
1.	<i>Les gènes impliqués</i> .....	- 28 -
2.	<i>Les manifestations cliniques</i> .....	- 28 -
3.	<i>Les caractéristiques histologiques</i> .....	- 28 -
D.	<i>Diagnostiques, traitements et difficultés</i> .....	- 30 -
1.	<i>La myopathie XLCNM</i> .....	- 30 -
2.	<i>La neuropathie CMT4B1</i> .....	- 31 -
III.	LE METABOLISME DES PHOSPHOINOSITIDES MEMBRANAIRES .....	- 32 -
A.	<i>Les lipides, constituants majoritaires des membranes</i> .....	- 32 -
B.	<i>Les PPI<sub>n</sub>, des médiateurs essentiels</i> .....	- 34 -
C.	<i>Voie de synthèse des polyphosphoinositides (PPI<sub>n</sub>)</i> .....	- 39 -
1.	<i>Le PtdIns, précurseur des PPI<sub>n</sub></i> .....	- 39 -
2.	<i>Le PtdIns4P</i> .....	- 40 -
3.	<i>Le PtdIns3P</i> .....	- 44 -
4.	<i>Le PtdIns5P</i> .....	- 51 -
5.	<i>Le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub></i> .....	- 53 -
6.	<i>Le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub></i> .....	- 57 -
7.	<i>Le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub></i> .....	- 59 -
8.	<i>Le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub></i> .....	- 64 -
D.	<i>Précurseurs des inositols solubles</i> .....	- 67 -

1.	Rôle du diacyglycérol (DAG) .....	- 67 -
2.	Rôle de l'inositol (1,4,5) trisphosphate (Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> ).....	- 68 -
IV.	LES MYOTUBULARINES .....	- 71 -
A.	<i>Une vaste famille</i> .....	- 71 -
B.	<i>Ymr1</i> .....	- 73 -
C.	<i>MTM1</i> .....	- 75 -
1.	Structure.....	- 75 -
2.	Fonction putative de MTM1 .....	- 82 -
D.	<i>MTMR2</i> .....	- 85 -
1.	Structure.....	- 85 -
2.	Fonction putative de MTMR2.....	- 87 -
E.	<i>MTMR12</i> .....	- 90 -
F.	<i>Les différentes MTMRs (Myotubularin-related proteins)</i> .....	- 90 -
1.	MTMR1 .....	- 90 -
2.	MTMR3 et MTMR4 .....	- 90 -
3.	MTMR6, MTMR7 et MTMR8 .....	- 92 -
4.	Sbf1/MTMR5 et Sbf2/MTMR13 .....	- 93 -
5.	MTMR9 .....	- 94 -
6.	MTMR10, MTMR11 .....	- 94 -
G.	<i>Relations et interactions entre les myotubularines</i> .....	- 95 -
V.	OBJECTIFS DE CETTE ETUDE .....	- 98 -
❖	<b>PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>101</b>
I.	LA MYOTUBULARINE MTM1.....	101
A.	<i>MTM1 a une fonction cellulaire indépendante de son activité 3-phosphatase</i> .....	101
B.	<i>Phosphatase Inactive Myotubularin Rescues X-linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice</i> 103	
C.	<i>Les niveaux de MTM1s sont régulés dans S. cerevisiae</i> .....	- 136 -
1.	Les MTM1s sont stables dans <i>S. cerevisiae</i> .....	- 137 -
2.	Les MTM1s actives ne sont pas préférentiellement dégradées par rapport aux inactives dans <i>S. cerevisiae</i> ....	- 138 -
D.	<i>Propriétés de liaison aux substrats de MTM1s recombinantes</i> .....	- 139 -
E.	<i>Activité enzymatique de MTM1s recombinantes</i> .....	- 143 -
1.	Production et purification de GST-MTM1 .....	- 143 -
2.	Test d'activité enzymatique <i>in vitro</i> .....	- 145 -
F.	<i>MTM1 est recrutée aux membranes dans S. cerevisiae</i> .....	- 148 -
1.	Les mutations analysées n'affectent pas l'association aux membranes de MTM1 .....	- 149 -
2.	Un choc osmotique ne relocalise pas MTM1 .....	- 151 -
3.	L'association aux membranes de MTM1 ne dépend pas des PPIn.....	- 151 -
4.	La Rab GTPase Ypt6 n'est pas responsable de la distribution membranaire des MTM1 dans <i>S. cerevisiae</i> ....	- 154 -
5.	L'association de MTM1 aux membranes est très stable.....	- 155 -

G.	<i>Effets de la surexpression de MTM1 dans S. cerevisiae sur diverses voies du trafic dépendants des PPIIn</i>	- 159 -
1.	Les myotubularines actives induisent une sécrétion de CPY	- 159 -
2.	MTM1 n'affecte pas la maturation de Ape1 dans <i>S. cerevisiae</i>	- 164 -
3.	Les MTM1 actives induisent un retard dans le tri de Fur4-GFP aux endosomes	- 168 -
4.	L'endocytose en phase fluide n'est pas affectée par MTM1	- 169 -
5.	Récupération de la morphologie vacuolaire après un choc osmotique	- 172 -
H.	<i>Localisation de MTM1 fusionnée à la GFP</i>	- 174 -
I.	<i>Analyse du mutant S376N</i>	- 178 -
II.	COEXPRESSION MTM1 / MTMR12	- 180 -
A.	<i>Phénotypes en coexpression</i>	- 180 -
B.	<i>MTM1 et MTMR12 interagissent dans S. cerevisiae</i>	- 183 -
C.	<i>MTM1 et MTMR12 cofractionnent lors d'un fractionnement subcellulaire</i>	- 184 -
D.	<i>La co-expression de MTM1/MTMR12 induit la sécrétion de CPY</i>	- 186 -
III.	MTMR2	- 187 -
A.	<i>La surexpression de MTMR2 dans S. cerevisiae n'altère pas la morphologie vacuolaire</i>	- 187 -
B.	<i>MTMR2 est cytosolique dans S. cerevisiae</i>	- 189 -
C.	<i>MTMR2 est très peu active in vivo dans S. cerevisiae</i>	- 190 -
IV.	DIFFERENCES ENTRE MTM1 ET MTMR2	- 191 -
A.	<i>Le domaine PH-GRAM de MTM1 et MTMR2 est parmi les domaines les moins conservé entre les deux myotubularines</i>	- 191 -
B.	<i>Génération des formes tronquées de MTMR2</i>	- 193 -
C.	<i>Les formes tronquées de MTMR2 induisent un élargissement vacuolaire</i>	- 193 -
D.	<i>Distribution subcellulaires des formes tronquées de MTMR2</i>	- 194 -
E.	<i>Les formes tronquées de MTMR2 induisent une sécrétion de CPY</i>	- 195 -
❖	<b>PARTIE III : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>- 199 -</b>
I.	QUELS SONT LES DYSFONCTIONNEMENTS RESPONSABLES DU DEVELOPPEMENT DE LA XLCNM ?	- 199 -
II.	QUELLES SONT LES DIFFERENCES DE FONCTIONS ENTRE MTM1 ET MTMR2 QUI EXPLIQUENT LEURS IMPLICATIONS DANS DEUX PATHOLOGIES DISTINCTES ?	- 203 -
III.	NOUVELLES QUESTIONS ?	- 205 -
❖	<b>PARTIE IV : REFLEXION PERSONNELLE</b>	<b>209</b>
❖	<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>213</b>
I.	SOUCHES DE LEVURES	213
II.	SOUCHES BACTERIENNES	213
III.	PLASMIDES	214
A.	<i>Plasmides de levures</i>	214
B.	<i>Plasmides de bactéries</i>	217
IV.	SOLUTIONS ET TAMPONS COURANTS	218
V.	MILIEUX	219

VI.	ANTIBIOTIQUES (CONCENTRATION DE TRAVAIL) .....	219
VII.	ANTICORPS .....	219
VIII.	CONDITIONS DE CULTURE .....	220
	A. Cultures bactériennes .....	220
	B. Cultures de levure .....	220
IX.	PROTOCOLES .....	220
	A. Purification des plasmides .....	220
	B. Digestions des plasmides et électrophorèse .....	220
	C. Préparation rapide de plasmides de levures .....	221
	D. Transformations des bactéries électrocompétentes .....	221
	E. Transformations des bactéries chimiocompétentes .....	221
	F. Transformations des levures .....	221
	G. Production et purification de hMTM1 fusionnée à la GST .....	222
	1. Production de GST-MTM1 .....	222
	2. Purification de GST-hMTM1 par chromatographie d'affinité .....	222
	H. Préparation d'extraits protéiques totaux de levures .....	223
	I. Western Blot et immunomarquage .....	223
	1. Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) .....	223
	2. Electrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose .....	223
	3. Coloration des membranes au rouge Ponceau .....	223
	4. Immunodétection .....	224
	J. Fractionnement subcellulaire .....	224
	K. Réaction enzymatique in vitro avec hMTM1 .....	224
	L. Chromatographie sur couche mince (TLC) .....	225
	M. Microscopie .....	225
	N. Temps de récupération après un stress hyperosmotique .....	225
	O. Marquage des cellules au FM4-64 .....	226
	P. Marquage des cellules au Lucifer Yellow .....	226
	Q. Induction de la synthèse et de l'endocytose de Fur4 .....	226
	R. coImmunoprécipitation .....	227
X.	OLIGONUCLEOTIDES UTILISES POUR LE CLONAGE .....	227
	A. Oligonucléotides « Forward » .....	227
	B. Oligonucléotides « Reverse » .....	228
	C. Paramètres d'amplification par PCR .....	228
❖	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>231</b>
❖	<b>LA MUSIQUE DE LA REDACTION DE THESE .....</b>	<b>249</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>FIGURE 1 :</b>	Quelques grandes figures à l'origine de la découverte et l'utilisation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	- 1 -
<b>FIGURE 2 :</b>	Vue graphique des gènes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> codant pour des protéines.	- 9 -
<b>FIGURE 3 :</b>	Catalogue non exhaustif des myopathies et dystrophies répertoriées sur Orpha.net	- 16 -
<b>FIGURE 4 :</b>	Gènes impliqués dans différentes neuropathies périphériques héréditaires.	- 20 -
<b>FIGURE 5 :</b>	Mutations faux-sens détectées dans MTM1 humain.	- 24 -
<b>FIGURE 6 :</b>	Mode de transmission lié au chromosome X du gène MTM1 muté.	- 25 -
<b>FIGURE 7 :</b>	Coloration de fibres musculaires de souris.	- 27 -
<b>FIGURE 8 :</b>	Mode de transmission autosomal récessif du gène MTMR2 muté.	- 29 -
<b>FIGURE 9 :</b>	Le phosphatidylinositol (PtdIns).	- 34 -
<b>FIGURE 10 :</b>	Quantités relatives des différents PPIIn chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et chez l'Homme.	- 35 -
<b>FIGURE 11 :</b>	Acides gras retrouvés majoritairement dans les PPIIn.	- 37 -
<b>FIGURE 12 :</b>	Schéma de la voie de synthèse et du devenir du PtdIns.	- 38 -
<b>FIGURE 13 :</b>	Synthèse du PtdIns chez <i>S. cerevisiae</i> et chez l'humain et les enzymes impliquées.	- 38 -
<b>FIGURE 14 :</b>	Synthèse du PtdIns4P et enzymes impliquées chez la levure <i>S. cerevisiae</i> et chez l'Homme.	- 41 -
<b>FIGURE 15 :</b>	Synthèse du PtdIns3P chez <i>S. cerevisiae</i> et l'humain et les enzymes en jeu.	- 47 -
<b>FIGURE 16 :</b>	Voie de signalisation PI3K/Akt et son implication dans divers processus biologique.	- 50 -
<b>FIGURE 17 :</b>	Synthèse du PtdIns5P et les enzymes impliquées chez l'Homme.	- 52 -
<b>FIGURE 18 :</b>	Synthèse du PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> et enzymes impliquées chez <i>S. cerevisiae</i> et chez l'Homme.	- 56 -
<b>FIGURE 19 :</b>	Synthèse du PtdIns(3,4)P <sub>2</sub> chez l'Homme et les enzymes impliquées.	- 57 -
<b>FIGURE 20 :</b>	Synthèse du PtdIns(3,5)P <sub>2</sub> et enzymes impliquées chez <i>S. cerevisiae</i> et chez l'Homme.	- 59 -
<b>FIGURE 21 :</b>	Modèle du complexe Vac14.	- 61 -
<b>FIGURE 22 :</b>	Synthèse du PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> chez l'Homme et enzymes impliquées.	- 65 -
<b>FIGURE 23 :</b>	Voies de signalisation en aval du PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> .	- 66 -
<b>FIGURE 24 :</b>	Cascades de phosphorylations à partir de l'Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> chez <i>S. cerevisiae</i> et chez l'Homme.	- 68 -
<b>FIGURE 25 :</b>	Fonctions cellulaires des inositols solubles.	- 69 -
<b>FIGURE 26 :</b>	Schéma global de la synthèse des différents PPIIn et enzymes impliquées chez <i>S. cerevisiae</i> et chez l'Homme.	- 70 -
<b>FIGURE 27 :</b>	Les myotubularines humaines.	- 72 -

<b>FIGURE 28 :</b>	Dosages des PPIIn chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sauvage (GYC121) ou <i>ymr1Δ</i> ( $\Delta$ YJR110W).	- 73 -
<b>FIGURE 29 :</b>	Observations microscopiques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sauvage (SEY6210) ou <i>ymr1Δ sjl3Δ</i> .	- 74 -
<b>FIGURE 30 :</b>	Dosage des PPIIn chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sauvage (WT SEY6210) ou <i>ymr1Δ sjl3Δ</i> .	- 74 -
<b>FIGURE 31 :</b>	Organisation des domaines de la myotubularine humaine MTM1 et mutations de patients.	- 75 -
<b>FIGURE 32 :</b>	Similarité structurale entre les domaines PH-GRAM et PH.	- 76 -
<b>FIGURE 33 :</b>	Structure prédite du domaine RID de MTM1 basée sur le modèle cristallographique de MTMR2.	- 78 -
<b>FIGURE 34 :</b>	Structure cristallographique de la poche catalytique de la myotubularine active MTMR2.	- 79 -
<b>FIGURE 35 :</b>	Domaine Coiled-coil de MTMR2.	- 81 -
<b>FIGURE 36 :</b>	Comparaison de l'organisation des domaines entre MTM1 et MTMR2.	- 85 -
<b>FIGURE 37 :</b>	Alignement des séquences peptidiques des extrémités N-terminales de MTM1 et MRMR2.	- 86 -
<b>FIGURE 38 :</b>	Structure cristallographique de la myotubularine MTMR2 en complexe avec le PtdIns(3,5)P <sub>2</sub> .	- 87 -
<b>FIGURE 39 :</b>	Modèle des interactions entre MTMR2, kif13B, Dlg1 et Sec8 aux sites d'homéostasie membranaire dans les cellules de Schwann.	- 89 -
<b>FIGURE 40 :</b>	Distribution cellulaires des myotubularines dans des cellules HeLa fixées.	- 95 -
<b>FIGURE 41 :</b>	Réseau d'interactions entre les membres de la famille des myotubularines.	- 97 -
<b>FIGURE 42 :</b>	Stabilité des myotubularines après blocage de la néosynthèse protéique par le cycloheximide.	- 137 -
<b>FIGURE 43 :</b>	Niveaux de MTM1 détectés par WB dans des mutants A) du protéasome ou B) des quatre protéases vacuolaires principales.	- 138 -
<b>FIGURE 44 :</b>	Représentation d'une membrane PIP array <sup>TM</sup> et les différents PPIIn en concentration décroissantes.	- 140 -
<b>FIGURE 45 :</b>	Analyse de l'affinité des domaines PH-GRAM de MTM1 sauvage ou des mutants V49F et R69C pour les différents PPIIn par PIP array <sup>TM</sup> .	- 140 -
<b>FIGURE 46 :</b>	Analyse de l'affinité de la protéine MTM1 sauvage ou des mutants V49F et R69C pour les différents PPIIn par PIP array <sup>TM</sup> .	- 141 -
<b>FIGURE 47 :</b>	Coloration au bleu de Coomassie des extraits protéiques purifiés par GST-pulldown.	- 143 -
<b>FIGURE 48 :</b>	Isolement des bandes principales après purification de GST-MTM1.	- 144 -
<b>FIGURE 49 :</b>	Analyse par spectrométrie de masse des bandes isolées après séparation sur gel.	- 144 -
<b>FIGURE 50 :</b>	Structure des BODIPY FL-PtdIns.	- 145 -
<b>FIGURE 51 :</b>	Activité enzymatique <i>in vitro</i> à partir des différentes formes de GST-MTM1 produites en bactéries.	- 147 -
<b>FIGURE 52 :</b>	Observation microscopique des phénotypes des levures exprimant différentes formes de MTM1 (DIC 100X).	- 149 -
<b>FIGURE 53 :</b>	Fractionnement subcellulaire d'extraits protéiques totaux de levures <i>ymr1Δ</i> produisant les différentes formes de MTM1.	- 150 -
<b>FIGURE 54 :</b>	Distribution de MTM1 sauvage dans <i>S. cerevisiae</i> en condition de choc osmotique.	- 151 -
<b>FIGURE 55 :</b>	Distribution de MTM1 WT dans différents mutants du métabolisme des PPIIn.	- 152 -
<b>FIGURE 56 :</b>	Distribution en fractionnement subcellulaire de MTM1 <sup>WT</sup> et MTM1 <sup>R69C</sup> dans une levure <i>ypt6Δ</i> .	- 154 -

<b>FIGURE 57 :</b>	Solubilisation de la myotubularine MTM1.	- 156 -
<b>FIGURE 58 :</b>	MTM1 est capable de s'oligomériser en heptamère.	- 159 -
<b>FIGURE 59 :</b>	Tri de la protéase vacuolaire CPY via la voie VPS.	- 160 -
<b>FIGURE 60 :</b>	Ymr1 hydrolyse un pool de PtdIns3P impliqué dans la voie VPS.	- 161 -
<b>FIGURE 61 :</b>	Analyse de la sécrétion de CPY dans des levures produisant les différentes formes de MTM1.	- 162 -
<b>FIGURE 62 :</b>	Représentation schématique des voies d'autophagie et Cvt chez la levure.	- 165 -
<b>FIGURE 63 :</b>	Complexes PtdIns 3-kinase contenant Vps34/Vps15/Vps30 chez la levure.	- 165 -
<b>FIGURE 64 :</b>	Analyse des effets des différentes formes de MTM1 sur la voie d'autophagie et la voie Cvt dans <i>S. cerevisiae</i> .	- 167 -
<b>FIGURE 65 :</b>	Analyse de la voie du trafic de l'uracile perméase Fur4-GFP dans <i>S. cerevisiae</i> .	- 169 -
<b>FIGURE 66 :</b>	Analyse de l'endocytose en phase fluide à l'aide du marqueur fluorescent Lucifer Yellow.	- 170 -
<b>FIGURE 67 :</b>	Schéma récapitulatif des différents marqueurs utilisés dans cette étude.	- 171 -
<b>FIGURE 68 :</b>	Récupération de la morphologie vacuolaire après un choc osmotique.	- 173 -
<b>FIGURE 69 :</b>	Observation microscopique de la localisation de MTM1 en fusion avec la GFP.	- 174 -
<b>FIGURE 70 :</b>	Observation microscopique à fluorescence de levures exprimant des formes de MTM1 fusionnées à la GFP.	- 175 -
<b>FIGURE 71 :</b>	Fractionnement subcellulaire d'extraits protéiques de levures produisant GFP-MTM1 et MTM1 non étiquetée.	- 176 -
<b>FIGURE 72 :</b>	Analyse de la production de différentes formes de MTM1 dans <i>S. cerevisiae</i> SEY6210 <i>ymr1Δ</i> .	- 178 -
<b>FIGURE 73 :</b>	Phénotypes vacuolaires des levures produisant MTM1 <sup>S376N</sup> .	- 179 -
<b>FIGURE 74 :</b>	Quantification des morphologies vacuolaires des levures produisant le mutant MTM1 <sup>S376N</sup> .	- 179 -
<b>FIGURE 75 :</b>	Observation microscopique de levure co-exprimant MTM1 et MTMR12.	- 181 -
<b>FIGURE 76 :</b>	Quantification des morphologies vacuolaires de levures co-exprimant MTM1 et MTMR12.	- 182 -
<b>FIGURE 77 :</b>	Co-immunoprécipitation de MTM1 et MTMR12 dans <i>S. cerevisiae</i> .	- 183 -
<b>FIGURE 78 :</b>	Fractionnement subcellulaire d'extraits protéiques de levures <i>ymr1Δ</i> co-exprimant <i>MTM1</i> et <i>MTMR12</i> .	- 185 -
<b>FIGURE 79 :</b>	Analyse de la sécrétion de CPY dans des levures co-exprimant <i>MTM1</i> et <i>MTMR12</i> .	- 186 -
<b>FIGURE 80 :</b>	Observation microscopique de levures <i>ymr1Δ</i> transformées avec le plasmide pVV200_MTMR2.	- 188 -
<b>FIGURE 81 :</b>	Quantification des morphologies vacuolaires des levures produisant MTMR2 <sup>WT</sup> .	- 188 -
<b>FIGURE 82 :</b>	Fractionnement subcellulaire de levures surexprimant MTMR2.	- 189 -
<b>FIGURE 83 :</b>	Analyse des niveaux de PPIIn monophosphates de levures produisant différentes formes de MTMR2.	- 190 -
<b>FIGURE 84 :</b>	Alignement des séquences amino-terminales de MTM1 et MTMR2.	- 193 -
<b>FIGURE 85 :</b>	Morphologies vacuolaires de levures SEY6210 <i>ymr1Δ</i> produisant des formes tronquées de MTMR2.	- 194 -

<b>FIGURE 86 :</b>	Distribution subcellulaire des formes tronquées de MTMR2 dans <i>S. cerevisiae</i> .	- 195 -
<b>FIGURE 87 :</b>	Analyse de la sécrétion de CPY dans des levures produisant les différentes formes tronquées de MTMR2.	- 196 -

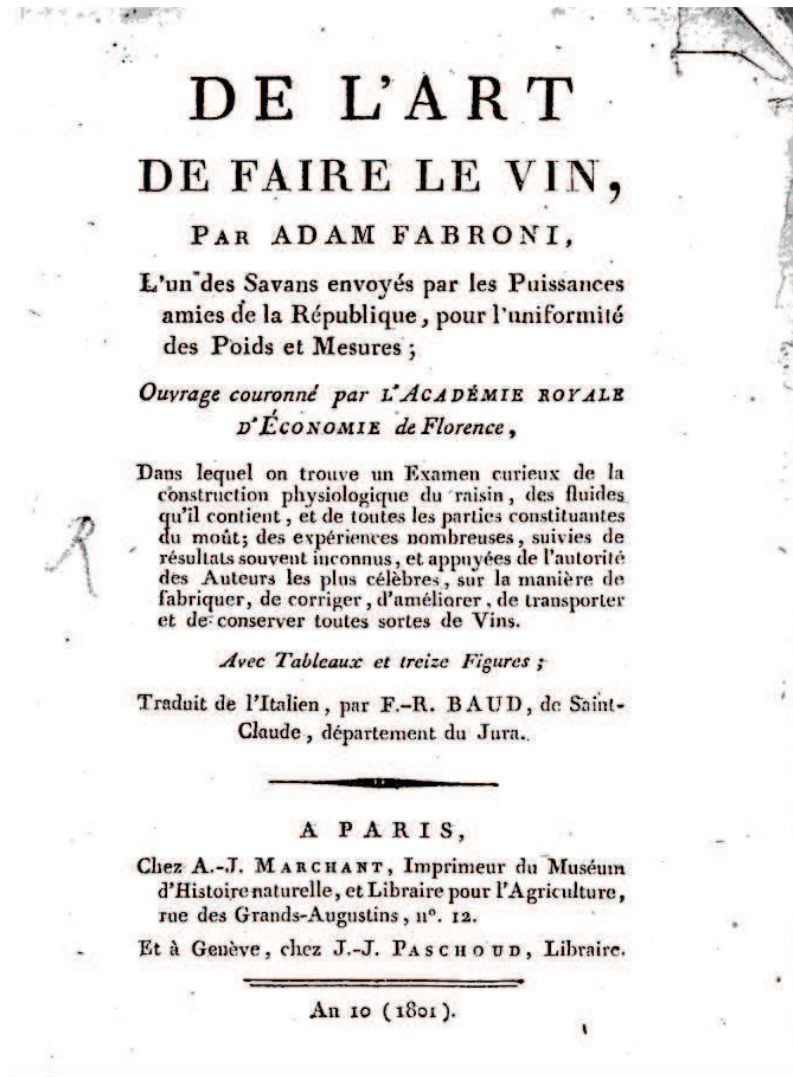
## TABLE DES ILLUSTRATIONS DE L'ARTICLE

<b>FIGURE 1 :</b>	Human Myotubularin expression in yeast <i>S. cerevisiae</i> .	- 107 -
<b>FIGURE S1 :</b>	Analysis of growth upon MTM1 expression in <i>ymr1Δ</i> yeast cells.	- 108 -
<b>FIGURE 2 :</b>	Yeast vacuolar phenotype analysis upon MTM1 expression.	- 109 -
<b>FIGURE S2 :</b>	Analysis of vacuolar morphology upon MTM1 expression in wild-type yeast cells.	- 111 -
<b>FIGURE S3 :</b>	Subcellular distribution of the different MTM1 mutants.	- 111 -
<b>FIGURE 3 :</b>	Vacuolar morphologies quantification in yeast cells producing MTM1.	- 112 -
<b>FIGURE 4 :</b>	Determination of different phosphoinositides (PPI <sub>n</sub> ) levels upon expression of MTM1 wild-type or mutant proteins.	- 113 -
<b>FIGURE S4 :</b>	<i>In vitro</i> phosphatase activity assays on the different MTM1 mutants.	- 114 -
<b>FIGURE 5 :</b>	Correction of muscle atrophy and fiber hypotrophy in a murine model of centronuclear myopathy by AAV-mediated expression of the phosphatase-dead myotubularin mutant MTM1 <sup>C375S</sup> .	- 116 -
<b>FIGURE 6 :</b>	The phosphatase-dead C375S myotubularin mutant corrects organelles mis-positioning and muscle force in <i>Mtm1</i> KO mice.	- 117 -
<b>FIGURE 7 :</b>	The phosphatase-dead C375S myotubularin mutant injection in <i>Mtm1</i> -KO muscle restores normal desmin expression and localization.	- 119 -
<b>FIGURE 8 :</b>	Correction of triad abnormalities present in <i>Mtm1</i> deficient muscles with AAV- <i>Mtm1</i> -WT and AAV- <i>Mtm1</i> -CS.	- 122 -
<b>FIGURE S5 :</b>	Model of MTM1-C375S and MTM1-S376N.	- 123 -
<b>FIGURE 9 :</b>	MTM1-WT but not MTM1-C375S normalizes PtdIns3P levels in the injected muscles.	- 123 -
<b>FIGURE S6 :</b>	Human Myotubularin expression in yeast <i>S. cerevisiae</i> .	- 124 -

## INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : LES MYOTUBULARINES SONT PRESENTES DANS DE NOMBREUX ORGANISMES, DE LA LEVURE JUSQU'A L'HOMME.....	- 71 -
TABLEAU 2 : MUTANTS FAUX-SENS DE MTM1 ANALYSES DANS CETTE ETUDE. ....	- 99 -
TABLEAU 3 : IDENTIFICATION PAR BLASTP DE PROTEINES DE LEVURES SIMILAIRES A RAC1 HUMAINE. ....	- 154 -





Première page de « De l'art de faire du vin » (1801)  
par Adamo Fabbroni (1748-1816)



**Charles Cagniard  
de Latour**  
(1777-1859)



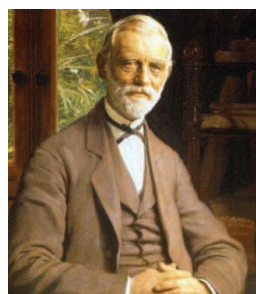
**Theodore Schwann**  
(1810-1882)



**Louis Pasteur**  
(1822-1895)



**Franz Julius  
Ferdinand Meyen**  
(1804-1840)



**Jacob Christian Jacobsen**  
(1811-1887)



**Emil Christian Hansen**  
(1842-1909)

Figure 1 : Quelques grandes figures à l'origine de la découverte et l'utilisation de *Saccharomyces cerevisiae*. A noter l'absence de Adamo Fabbroni faute de portrait disponible. Néanmoins, son ouvrage « De L'art de faire du vin » est disponible gratuitement en traduction française sur [google.books.fr](http://google.books.fr).

## ❖ PARTIE I : INTRODUCTION

### I. La levure *Saccharomyces cerevisiae*

#### A. Un peu d'histoire ...

Les levures fermentaires sévissent depuis des milliers d'années en nous fournissant notre « drogue préférée » ; elles sont en effet utilisées depuis l'Antiquité non seulement pour la panification, mais aussi pour la vinification et la fabrication de bière. Néanmoins, il faudra attendre le XIX<sup>ème</sup> siècle et les travaux initiés en 1787 par **Adamo Fabbroni** (1748-1816) dans son livre « Ragionamento sull'arte di far vino » (raisonnement sur l'art de faire du vin), puis défendus par **Charles Cagniard de Latour** (1777-1859) et **Theodore Schwann** (1810-1882) et finalement poursuivis par **Louis Pasteur** (1822-1895) (Figure 1) dans les années 1850 pour démontrer la nature vivante des levures utilisées pour les procédés de fermentation. Les courants de pensées de l'époque estimaient jusqu'alors que la fraction récoltée à partir du moût de fruits consistait en une pâte inerte ayant une action purement catalytique ; au mieux, les levures présentes se décomposaient au cours de ce « processus chimique ». Pasteur démontra que la production d'alcool était bien due à l'activité de ces micro-organismes capables de transformer le sucre en éthanol.

De manière surprenante, durant cette controverse, le médecin et botaniste allemand **Franz Meyen** (1804-1840) (Figure 1) identifie, décrit et nomme en 1837 « *Saccharomyces cerevisiae* » en référence l'affinité pour le sucre (*Saccharo-*) que manifeste ce champignon (*-myces*) et son utilisation dans la fabrication de la bière (*cerevisiae*, la cervoise gauloise). La caractérisation et la détermination de la nature vivante de cet organisme a permis par la suite à *Saccharomyces cerevisiae* d'être cultivée et commercialisée.

#### *De la petite brasserie à l'industrie, de la boulangerie à la paillasse ...*

En 1875, **Jacob Christian Jacobsen** (1811-1887) (Figure 1), un industriel danois visionnaire, crée le « laboratoire Carlsberg » à Copenhague, dans le but d'accroître les connaissances scientifiques dans le domaine de la brasserie et de développer des méthodes de

production industrielle de bière. Il engage le mycologiste et physiologiste de la fermentation **Emil Christian Hansen** (1842-1909) (Figure 1). Ce dernier réalise que les ferments utilisés jusque-là comptaient en réalité une multitude d'espèces de levures. Il perfectionne les méthodes de culture de Louis Pasteur et parvient à isoler des clones purs à partir de colonies isolées. Il sélectionne alors les clones les plus intéressants en fermentation, si bien qu'il réussit à produire des levures pures en très grande quantité (Greig and Leu, 2009). Pour anecdote, il nomma une espèce utilisée pour la confection de bière de type « Lager », à fermentation basse, *Saccharomyces carlsbergensis*, en référence au nom de la brasserie. Cette dernière a depuis été renommée *S. pastorianus*.

Bien que les travaux de Hansen n'aient finalement servi qu'à produire une bière, selon moi, somme toute peu goutue, ils constituent néanmoins un tournant dans la manipulation des micro-organismes de type levures. En effet, la capacité à isoler et propager des clones purs est à la base de toute la génétique moderne de la levure. La levure passait alors d'un statut de simple ingrédient d'une recette à un véritable outil scientifique de la compréhension du vivant.

Au cours des décennies suivantes, les levures ont commencé à infiltrer les laboratoires de microbiologie et de recherches fondamentales et ont été sélectionnées pour mieux satisfaire aux besoins des expériences. En effet, certaines caractéristiques utiles dans un environnement sauvage, peuvent s'avérer contrariantes dans la manipulation en laboratoire de ces organismes. Par exemple les souches de levures utilisées en laboratoire ont été sélectionnées sous une forme non agglomérante, ce qui facilite l'observation et l'isolation de clones.

**En conclusion de cette rubrique, retenons que les levures, et plus particulièrement *S. cerevisiae*, sont devenues au fil des décennies les principaux modèles d'études de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que les mécanismes de réplication, de réparation et de recombinaison de l'ADN, d'épissage de l'ARN, de cycle cellulaire, mais également de voies de signalisations, de trafic intracellulaire, de métabolisme ou d'enzymologie.**

## B. Généralités

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un micro-organisme unicellulaire **eucaryote** appartenant au règne des « fungi » (ou mycètes) appelé plus communément le règne des « champignons ». Comme nous l'avons vu précédemment, elle porte plusieurs appellations plus populaires telles que « levure de boulanger », « levure de bière » ou « levure bourgeonnante ». *S. cerevisiae* se présente sous la forme d'une cellule ovoïde d'une taille de 5 à 10µm. Son génome est composé de 16 chromosomes, portant une estimation de 6607 ORF (Open Reading Frame, ou Cadre Ouvert de Lecture) correspondant à 12,1 millions de paires de bases sur un génome de 12,5 millions de paires de bases. Elle se divise en créant un « bourgeon » grandissant correspondant à la cellule-fille naissante, laquelle finira par s'individualiser, d'où sa dénomination de « levure bourgeonnante ».

Ce mode de division se distingue en particulier de celui de *Schizosaccharomyces pombe*, une autre levure de forme cylindrique et dite « à fission » car son mode de division consiste en une division médiane de la cellule mère donnant naissance à deux cellules de tailles identiques.

Avec ce dernier point, je souhaiterais évoquer l'énorme divergence évolutive au sein même du phylum des Ascomycètes. En effet, Dujon et ses collaborateurs montrent en 2004 que la distance évolutive couverte par les quatre différentes levures analysées dans leur étude (Dujon et al., 2004) est au moins aussi vaste que celle qui s'étend des invertébrés marins à l'humain. Par conséquent, dire que l'on étudie la « levure », sans autre précision, n'a pas de réelle signification si ce n'est que les levures représentent un phylum.

Il est important pour moi d'attirer l'attention sur ce dernier point puisque tout au long de mon manuscrit, je serai amené à user de ce raccourci. **Néanmoins, lorsque je parlerai de « levure(s) », je ne ferai référence qu'à *Saccharomyces cerevisiae* sauf mention contraire explicite.**

## 1. *S. cerevisiae*, un modèle d'étude très commode

*S. cerevisiae* est l'un des organismes eucaryotes les plus étudiés et les mieux caractérisés pour de nombreuses raisons. Tout d'abord, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la manipulation de *S. cerevisiae* à des fins scientifiques dure depuis plus d'un siècle. Nos connaissances à son sujet sont donc considérables.

De plus sa culture en laboratoire est extrêmement facile. Les conditions de manipulation ne nécessitent qu'un matériel basique (boîte de Pétri, cure-dents, öse, bec Bunsen, étuve).

Son temps de génération est d'environ 90 minutes à 30°C en milieu riche. On peut par conséquent obtenir une biomasse très importante en un temps très réduit.

Les cellules sont aisément conservables quelques jours sur la paillasse, quelques semaines à 4°C ou plusieurs années à -80°C en présence de glycérol. Toute souche, mutation ou croisement peut donc être stocké, répertorié et enrichir le catalogue monumental des collections de levures.

*Saccharomyces cerevisiae* (S288c) est le premier eucaryote à voir son génome entièrement séquencé (Goffeau et al., 1996). Cet exploit est le fruit de la collaboration de plus de 600 scientifiques du monde entier et témoigne d'une forte volonté et d'un l'effort collectif de la part de la communauté scientifique des « levuristes » d'accroître nos connaissances sur cet organisme. La séquence a été rendue publique et une base de données a été créée, la *Saccharomyces* Genome Database (SGD, <http://www.yeastgenome.org/>). Cette dernière constitue un trésor d'information pour quiconque souhaite recueillir des données de séquence, de fonction, de localisation ou d'interaction d'un gène ou de son produit. Cette base de données est en constante évolution et intègre les travaux les plus récents.

Par ailleurs le séquençage de *S. cerevisiae* lui a permis d'être un des rares organismes à bénéficier d'un programme de délétion systématique de la plupart de ses quelques 6607 ORF (*Saccharomyces Genome Deletion Project*, [http://sequence-www.stanford.edu/group/yeast\\_deletion\\_project/deletions3.html](http://sequence-www.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html)) (Winzeler et al., 1999). Cette incroyable collection de mutants de délétion est bien entendu à la disposition de la communauté scientifique via le site EUROSCARF (EUROpean *Saccharomyces Cerevisiae*

ARchive for Functional analysis) (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>) (Brachmann et al., 1998).

L'avantage le plus important de *S. cerevisiae* est sans aucun doute la facilité qu'elle offre en termes de manipulation génétique. En effet, *S. cerevisiae* est devenue un outil de choix en analyse génétique puisqu'elle possède un cycle haplo-diplo-biontique, c'est-à-dire qu'elle présente deux phases de vie distinctes : **haploïde** et **diploïde**. L'avantage d'utiliser des levures haploïdes en laboratoire réside dans le fait que chaque allèle de gène n'est représenté qu'une seule fois. De cette manière, une unique modification génétique (mutation ou délétion) peut potentiellement entraîner une modification du phénotype. Ce dernier point, trop long pour faire l'objet d'un paragraphe, sera étoffé dans le point suivant.

## 2. *S. cerevisiae*, un outil de génétique

*S. cerevisiae*, dans sa phase haploïde (1 seul jeu de « n » chromosomes) existe sous deux formes que l'on pourrait apparenter aux sexes de la levure. S'il n'existe pas de levures mâles ou femelles, on les définit par les « signes » **a** ou **α (alpha)**, selon le type d'hormones sexuelles qu'elles sécrètent. Une levure d'un signe donné exprimera à sa surface les récepteurs de l'hormone du signe opposé au sien. La sécrétion de ces hormones est un processus indispensable pour permettre la conjugaison/fusion de deux levures haploïdes.

Les souches utilisées dans cette étude sont hétérothalliques, c'est-à-dire que les cellules diploïdes (2n) ne peuvent être formées qu'après conjugaison entre **deux cellules haploïdes de types sexuels opposés provenant de spores différentes**. Cette caractéristique est un clair avantage en comparaison à une souche homothallique, laquelle peut donner naissance à des cellules diploïdes capables de méiose **à partir d'une colonie cellulaire haploïde issue d'une seule spore**. La présence de telles cellules homothalliques parasiterait toute analyse génétique et rendrait les résultats difficilement exploitables. L'hétérothallisme des souches utilisées en laboratoire permet de cultiver une souche sous sa forme haploïde sans qu'elle ne crée de cellules diploïdes. Il est ainsi possible de contrôler les événements de conjugaison et de réaliser les croisements entre les génotypes de son choix.

Il est possible de conjuguer deux souches de levure de génotypes différents et de sélectionner la descendance possédant les gènes souhaités au sein d'un même individu. Pour cela, on croise une souche Mat a possédant un des gènes d'intérêt avec une souche α présentant l'autre gène (ou inversement) pour créer des diploïdes pourvu des deux gènes provenant chacun de l'une des cellules haploïdes. Les cellules diploïdes ont sensiblement la même apparence bien que plus grande (environ 8 μm, contre 5 μm pour une cellule haploïde) et sont tout aussi viables que les cellules haploïdes. Néanmoins la levure diploïde (2n) est plus résistante en condition de vie défavorable (carence en sources carbonées ou azotées) car elle peut entrer dans une phase de sporulation. Cet événement aboutira via un processus de méiose à la création d'asques contenant quatre spores haploïdes non-ordonnées : deux spores de type a et deux spores de type α, qui auront subi au cours de la méiose les processus de brassage intra- et inter-chromosomique (ou recombinaison). Les asques peuvent être disséquées de manière à individualiser chacune des spores, lesquelles pourront former de nouvelles colonies

haploïdes. Il suffira alors de sélectionner les individus qui auront acquis les deux caractères parentaux recherchés. Là encore, la levure se révèle être un outil très commode.

Effectivement, un autre avantage non négligeable de la levure est la possibilité de sélectionner facilement un diploïde ou une cellule transformée grâce aux marqueurs d'auxotrophie. L'auxotrophie se définit comme l'incapacité de synthétiser *de novo* des composés organiques essentielles à la survie du micro-organisme. En effet, de nombreuses souches utilisées en laboratoire portent des mutations dans certains gènes codant pour des acteurs de voies de biosynthèse d'acides aminés. En conséquence, les levures, incapables de synthétiser certains acides aminés, ne pourront croître que si l'on supplémente le milieu de culture avec le ou les acides aminés en question. Il est cependant possible de compléter ces auxotrophies par l'apport du gène sauvage :

- soit par la transformation avec un plasmide portant à la fois le gène complétant l'auxotrophie et un gène d'intérêt,
- soit par insertion (par recombinaison homologue) du gène complétant l'auxotrophie dans le génome de la levure (intégration ou remplacement). Cette dernière méthode est souvent utilisée pour interrompre ou supprimer un gène d'intérêt et sélectionner cette interruption/délétion par une complémentation d'auxotrophie.
- soit par formation d'un diploïde après croisement avec un haploïde prototrophe du signe sexuel opposé.

La méthode inverse, à savoir sélectionner une souche en créant une auxotrophie est également appliquée, bien que cette technique de sélection négative soit plutôt utilisée pour introduire une mutation au locus d'un gène ou pour sélectionner par « plasmid shuffling » une souche ayant perdu le plasmide portant l'auxotrophie (et donc le gène d'intérêt). Pour cela, on insère (par recombinaison homologue ou par transformation) dans la levure le gène impliqué dans la voie de biosynthèse d'un acide aminé (généralement le gène *URA3* qui code pour une enzyme de la voie de synthèse de l'uracile). Ceci rendra la cellule prototrophe pour l'uracile. Après transformation, soit par un second plasmide portant un autre marqueur de sélection que *URA3*, soit par le gène portant la mutation désirée, les cellules sont mises en présence d'acide 5-fluoroorotique (5-FOA) qui est converti par Ura3 en 5-fluorouracile toxique, ainsi les cellules auxotrophes *ura<sup>-</sup>* seront sélectionnées.



Il existe par ailleurs des systèmes de sélection par résistance à un antibiotique « eucaryote », notamment le module KanMX (Wach et al., 1994) ou le gène *neo* conférant la résistance à la généticine (G418).

**La liste n'est pas exhaustive et la levure *S. cerevisiae* possède encore d'autres avantages (double hybride, triple hybride, complémentations fonctionnelles, létalité synthétique). Cependant, ce n'est pas l'objectif de ce manuscrit et par conséquent je ne m'étendrai pas plus. Il me semblait toutefois approprié de faire une courte apologie de ce fascinant micro-organisme et de tout le potentiel qu'il recèle.**

### **C. *S. cerevisiae* ... pas complètement différente des eucaryotes supérieurs**

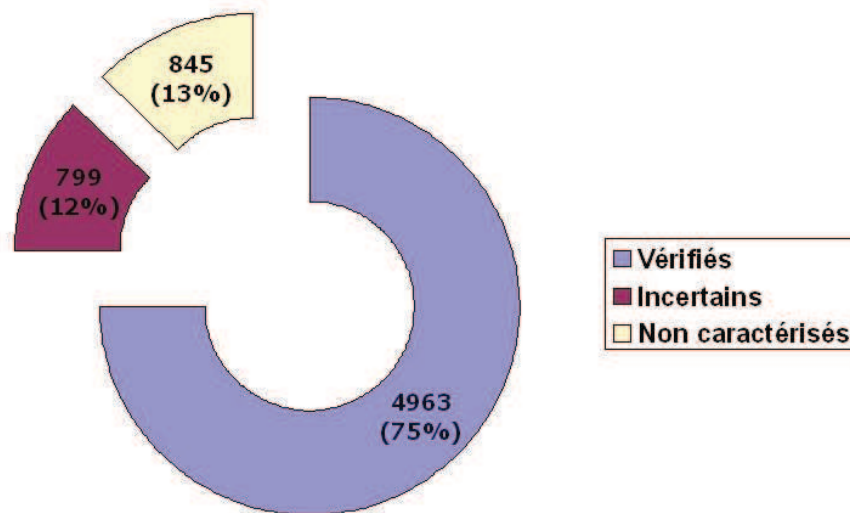
L'un des points importants dans cette étude est la validité du modèle levure dans l'analyse de mécanismes cellulaires fondamentaux et conservés de manière plus ou moins remarquable au cours de l'évolution. Ainsi, il est essentiel de cerner le potentiel de la levure dans de telles études mais également de définir les limites dans l'utilisation d'un hémiascomycète pour la compréhension de processus physiologiques d'**eucaryotes supérieurs pluricellulaires** tels que la souris ou l'homme.

Malgré tout, en de nombreux points, *S. cerevisiae* ressemble à une cellule d'eucaryote supérieur. En effet, son organisation intracellulaire est proche de ce que l'on retrouve chez les mammifères. A l'instar de ces derniers, *S. cerevisiae* possède un noyau, des mitochondries, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des endosomes, des péroxisomes, une vacuole (l'équivalent du lysosome des mammifères) ou encore des vésicules de transport. En plus de ses organelles intracellulaires, la levure partage de grandes similarités dans l'organisation de son cytosquelette, de ses systèmes de sécrétion, de sa régulation métabolique, dans la mécanique de ses chromosomes ou, ce qui nous intéresse ici, dans le métabolisme des lipides membranaires.

Il est difficile de comparer la levure *S. cerevisiae* à *Homo sapiens* mais plusieurs études ont livré des estimations du degré de conservation entre ces deux organismes. Ces

informations peuvent se révéler très intéressantes pour comprendre certains processus cellulaires de cellules de mammifères potentiellement conservés chez la levure. L'analyse dans un modèle eucaryote « simple » peut s'avérer précieuse pour ouvrir la voie sur la compréhension des mécanismes dans un modèle plus complexe de cellules de mammifères.

A titre d'information, on estime aujourd'hui à environ 87% la proportion de gènes de *S. cerevisiae* pour lesquels on possède une compréhension de leur rôle biologique, même si ce n'est parfois que rudimentaire (pour 12% d'entre eux) (Figure 2). Cette proportion est bien supérieure à celle de n'importe quel autre organisme eucaryote, l'humain y compris. Les 13% restants correspondent à des ORFs non caractérisées à l'heure actuelle (Pena-Castillo and Hughes, 2007).



**Figure 2 : Vue graphique des gènes de *Saccharomyces cerevisiae* codant pour des protéines.** (d'après les données de <http://www.yeastgenome.org>, (14 mars 2012))

En 1997, un peu plus d'un an après la publication de la séquence génomique de *S. cerevisiae*, Botstein et ses collaborateurs ont effectué une comparaison entre les séquences protéiques de *S. cerevisiae* et celles répertoriées à l'époque dans GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Ils montrent que pour presque 31% des gènes de levures susceptibles de coder pour des protéines, il existe un homologue mammifère (Botstein et al., 1997). Ils précisent par ailleurs que ce chiffre est probablement sous-estimé puisque la base de données était largement incomplète et ne contenait pas les séquences de toutes les protéines de mammifères, voire probablement même dépourvue d'un représentant pour chaque famille de protéines. Néanmoins, ils étaient particulièrement optimistes quant à

l'utilité de *S. cerevisiae* pour avoir une information fonctionnelle de protéines humaines (ou de domaines) impliquées dans des pathologies en inspectant la fonction de l'homologue de levure, chez qui les manipulations génétiques sont beaucoup plus faciles et moins coûteuses.

En 2006, Smith et ses collaborateurs estiment qu'au moins 60% des gènes de levure possèdent des homologues humains, ou au moins un domaine conservé avec l'homologue humain (Smith and Snyder, 2006). De plus, d'autres estimations font mention qu'au moins 30% des gènes impliqués dans des pathologies humaines comptent des orthologues dans le protéome de la levure (Bassett et al., 1996; Foury, 1997).

Enfin, une étude plus récente a eu pour ambition de définir la validité du modèle *Saccharomyces cerevisiae* dans l'étude de mécanismes conservés chez d'autres organismes. Dans leur analyse, Karathia et al. ont comparé le degré de conservation des protéines entre *S. cerevisiae* et plus de 704 organismes différents. Leurs résultats ont permis de prédire si *S. cerevisiae* peut s'avérer être un bon modèle pour l'étude de processus cellulaires spécifiques dans d'autres classes d'organismes. Ainsi, ils ont montré que les mécanismes d'ARN polymérase (29 gènes), de réplication (30 gènes) ou de réparation de l'ADN (34 gènes), de phosphorylation oxydative (76 gènes), des ribosomes (176 gènes) et les voies telles que celle du lysosome (14 gènes), de l'endocytose (33 gènes), de la voie de signalisation des MAPK (55 gènes) ou de la protéolyse médiée par l'ubiquitine (44 gènes) de *S. cerevisiae* sont bien plus proches des eucaryotes que ceux des procaryotes (lorsqu'ils existent). A l'inverse, leurs résultats appellent à la prudence dans l'utilisation de *S. cerevisiae* pour l'étude des mécanismes régulant le cycle cellulaire. En effet, parmi les voies essentielles à la vie, les gènes contrôlant le cycle cellulaire semblent être uniques chez *S. cerevisiae* et les *Saccharomycetes* (115 gènes) puisqu'une petite fraction seulement des protéines correspondantes possède des orthologues chez les autres eucaryotes (Karathia et al., 2011). Leur étude comparative est très intéressante dans la mesure où elle peut aider à choisir le meilleur organisme modèle pour l'étude d'une voie de signalisation, d'un processus cellulaire ou d'une voie du trafic pour l'humain par exemple.

Sur ses 6607 ORF, on a identifié chez *S. cerevisiae* environ 1000 gènes (soit environ 15%) comme étant des membres de familles de gènes orthologues associées à des pathologies humaines (Heinicke et al., 2007). Pour une grande partie de ces gènes, les homologues de

mammifères sont fonctionnels et complètent des mutants de délétion de levures (Estela et al., 2011).

En exemple, on peut citer les travaux sur le syndrome de Lynch (ou Cancer du Colon Hériditaire Non Polyposique, HNPCC) : en 1993, Aaltonen et al. montrent qu'une instabilité dans des séquences répétées de l'ADN de tumeurs du colon était la cause probable de la pathologie. Ils font le rapprochement entre la pathologie et le chromosome 2 sans parvenir à définir avec précision le gène muté (Aaltonen et al., 1993). La même année, Strand et al. montrent un phénotype similaire dans la levure et associent le défaut de stabilité de l'ADN à des mutations dans trois gènes candidats : *PML1*, *MLH1* et *MSH2* (Strand et al., 1993). Il sera démontré avant la fin de l'année 1993 que le gène humain *MSH2* est impliqué dans le développement du syndrome de Lynch (Fishel et al., 1993). *MSH2* code pour une protéine se fixant sous forme d'hétérodimère aux mésappariements de l'ADN afin d'initier la réparation. L'extrême conservation de ce mécanisme entre la levure et l'humain a permis d'identifier chez l'Homme un des gènes impliqués dans le cancer du colon héréditaire non polyposique.

Un autre exemple, plus récent, montre l'intérêt de *S. cerevisiae* dans la découverte de molécules susceptibles d'avoir un effet thérapeutique sur les maladies à « prions ». Ces dernières sont des structures infectieuses composées de protéines endogènes mal repliées. Les maladies à prions, telles que les encéphalites spongiformes ou la maladie de Creutzfeldt-Jakob, touchent aussi bien le bétail et les humains que les médias : qui n'a jamais entendu parler de la « vache folle » ou « la tremblante du mouton » ? Ces pathologies sont particulièrement graves, les prions étant des particules très résistantes. Il n'existe d'ailleurs à ce jour aucun traitement efficace.

Ainsi l'équipe de Marc Blondel a profité du fait qu'à l'instar des mammifères, *S. cerevisiae* peut développer de telles particules infectieuses. Des levures [*PSI*<sup>+</sup>] et [*URE3*] présentant de tels prions ont été criblées à l'aide d'une chimiothèque de molécules à potentiel thérapeutique (Bach et al., 2003). Les molécules ayant un effet possible ont alors été sélectionnées sur la base d'une différence de coloration des levures rouges/blanches. En effet, l'une des conséquences de la présence de prion est la tendance à continuer la traduction au-delà du codon STOP. Ainsi, l'utilisation de l'allèle *ade1-14* présentant une mutation W240→STOP a permis la croissance de colonies blanches [*PSI*<sup>+</sup>], le codon STOP n'entraînant pas l'arrêt de la synthèse de l'enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'adénine. A l'inverse, les colonies [*psi*<sup>-</sup>] vont produire des enzymes tronquées et conduire à la formation de colonies rouges. En déposant des pastilles imbibées de la molécule à tester sur

un tapis de levures [*PSI*<sup>+</sup>] et en réalisant une simple lecture rouge/blanc, on peut visualiser un potentiel effet « anti-prions » (Bach et al., 2006). Plusieurs molécules se sont avérées être aussi efficaces chez les mammifères que chez la levure. La réciproque a également été vérifiée et validée. Les avantages de cette méthode sont nombreux :

- on peut réaliser un criblage à très grande échelle (des milliers de molécules testables)
- le test est très rapide (réponse en quelques jours)
- le test est peu coûteux
- la méthode est potentiellement automatisable

Ces expériences montrent une nouvelle fois l'utilité de la levure dans l'analyse de mécanismes cellulaires de mammifères. Cette étude reflète surtout la grande conservation entre la levure et les mammifères notamment des mécanismes responsables de la formation des prions et donc au niveau des molécules actives contre ces prions. Ainsi, une des molécules isolées dans ce crible a une activité anti-prion *in vivo* chez la levure et dans un modèle de souris transgénique (Tribouillard-Tanvier et al., 2008).

Un type de criblage similaire a été utilisé par la même équipe en vue d'isoler des molécules actives dans le cadre de maladies mitochondriales humaines héréditaires, affectant l'ATP synthase et plus particulièrement le syndrome NARP (Neuropathy, Ataxia, Retinitis Pigmentosa) (Couplan et al., 2011). En effet, la levure est un bon modèle pour l'étude de certaines maladies mitochondriales humaines (Foury and Kucej, 2002). Dans leurs travaux, Couplan et al. ont profité de la propriété unique de *S. cerevisiae* de pouvoir survivre en absence de production d'ATP par la phosphorylation oxydative. L'utilisation d'une levure mutante pour le gène *FMCI* impliqué dans l'assemblage du secteur F<sub>1</sub> de l'ATP synthase à haute température (35-37°C) constitue leur souche de référence. En effet, à température élevée (35°C), cette souche ne produit que très peu d'ATP, affiche un retard de croissance en condition de respiration (sur milieu glycérol) et ne présente qu'une très faible quantité de complexes ATP synthase assemblés (seuls les complexes assemblés sont entièrement fonctionnels). Le dépôt de pastilles imbibées des molécules à tester sur un tapis de cellules *fmc1Δ* a permis de sélectionner les composés permettant d'améliorer la vitesse de croissance des levures, c'est-à-dire ayant amélioré leur respiration liée à la fonction mitochondriale.

La levure est également un très modèle pour étudier les maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Khurana and Lindquist, 2010). Des travaux récents ont d'ailleurs une nouvelle fois montré la commodité du modèle levure dans le

criblage de facteurs génétique pouvant jouer un rôle dans la maladie d'Alzheimer, en particulier sur l'effet toxique des oligomères de peptides  $\beta$ -amyloïdes retrouvés chez patients atteints d'Alzheimer. Pour cela, les auteurs ont développé un modèle levure où la présence de peptides  $\beta$ -amyloïdes induit un retard de croissance chez *S. cerevisiae*. Le criblage à l'aide d'une librairie de 5532 ORFs leur a permis d'identifier de nouveaux facteurs modifiant la toxicité induite les peptides  $\beta$ -amyloïdes et par conséquent ayant un rôle dans le développement d'Alzheimer (Treusch et al., 2011).

Enfin, *S. cerevisiae* est un des organismes modèles qui a ouvert la voie aux nouveaux champs de recherche tels que la « génomique fonctionnelle » et la « biologie des systèmes » pour les organismes eucaryotes. Ces disciplines tirent avantages de l'étendue des connaissances de ce remarquable modèle eucaryote, non pas à l'échelle d'un gène ou d'une protéine mais à celle de la cellule vivante. En d'autres mots, au-delà de la fonction d'un gène unique, il est nécessaire de comprendre comment un ensemble de gènes (ou de protéines) interagissent et coopèrent dans l'intérêt du « système », à savoir la cellule ou l'organisme entier, comme par exemple lors du processus d'apoptose (Kirschner, 2005; Mustacchi et al., 2006).

## D. Nomenclature des gènes et protéines

En l'absence de convention appliquée à l'échelle internationale, j'utiliserai les nomenclatures suivantes pour les gènes et protéines des différents organismes.

### 1. Chez la levure

Le **gène sauvage** de levure est écrit en majuscule et en italique : *YMR1*

Les **gènes portant une mutation** sont écrits en minuscule et en italique : *ymr1*

Les **mutations de délétion** sont suivies du signe « Δ » : *ymr1Δ*

Le **produit d'un gène** est écrit avec une lettre majuscule suivie de deux minuscules (sans italique). Ymr1. La lettre « p », pour « protéine » est parfois ajoutée à la fin : Ymr1p

### 2. Chez l'humain

Le **gène sauvage humain** est écrit en majuscule et en italique : *MTM1*

Les **gènes portant une mutation** seront écrits en minuscule et en italique suivi de l'appellation de la mutation : *mtm1-C375S* ou *mtmt1<sup>C375S</sup>*

Le **produit d'un gène** est écrit en lettres majuscules uniquement (sans italique) : MTM1

### 3. Chez la souris

Le **gène sauvage murin** est écrit avec la première lettre en majuscule suivi de minuscules et en italique : *Mtm1*

Les **gènes portant une mutation** sont écrits comme le gène sauvage, suivi de la désignation de la mutation : *Mtm1-S376N* ou *Mtm1<sup>S376N</sup>*

Les **mutations « knock-out »** sont notées comme le gène sauvage (première lettre majuscule, italique) et suivies de « KO » : *Mtm1 KO*

Le **produit d'un gène** est écrit en lettres majuscules uniquement (sans italique) : MTM1







## II. Myopathies et syndromes de Charcot-Marie-Tooth

### A. Une dénomination vaste

La caractérisation d'une pathologie passe toujours en premier lieu par l'examen clinique complet du patient. Quels sont les tissus ou organes touchés ? Présente-t-il les particularités morphologiques typiques d'une maladie ? Ses capacités intellectuelles ou physiques sont-elles altérées ? Le profil des symptômes permet en général d'orienter le diagnostic et de déterminer la maladie. Si dans de rares cas le diagnostic est évident, la caractérisation d'une maladie musculaire ou neuromusculaire est souvent plus compliquée qu'il n'y paraît. Ceci pour plusieurs raisons :

- une faiblesse musculaire peut avoir de multiples origines : **fatigue** (manque de sommeil, état grippal), **musculo-squelettique** (traumatisme, arthrose), **infectieuse** (maladie de Lyme), **génétique** (mutations)
- une faiblesse musculaire n'est que la manifestation finale d'un défaut pouvant provenir de mécanismes bien plus en amont. Par exemple, une innervation incorrecte du muscle entraînera une faiblesse musculaire même si le muscle en question conserve (en théorie) tout son potentiel contractile. Il faut par conséquent déterminer si c'est le muscle (myopathie) ou le système nerveux en relation avec les muscles (neuro-myopathie) qui est affecté.
- le « catalogue » des maladies musculaires identifiées est très étoffé mais loin d'être complet (Figure 3). De plus, la distinction entre certaines formes de maladies musculaires est parfois très subtile. De ce fait, il est très souvent nécessaire de procéder à des analyses génétique complémentaires afin d'identifier avec précision le gène impliqué.

Au cours des deux dernières décennies, nos connaissances dans le domaine des maladies neuro-musculaires ont gagné du terrain, notamment grâce aux outils d'analyse génétique tels que le développement des techniques de PCR et des méthodes de séquençage mais également par la communication entre spécialistes et cliniciens du monde entier. Ainsi,

un grand nombre de maladies neuro-musculaires de zones géographiques telles que les Amériques, le Moyen-Orient, l'Asie ou l'Afrique sont venues compléter l'inventaire des maladies neuro-musculaires connues en Europe.

Ce dernier point est très important à mon sens puisqu'il permet de mieux cerner la nature de certains gènes en les associant à des pathologies et de dresser un tableau des mécanismes garantissant l'intégrité de l'organisme. Malheureusement, le nombre de gènes et de mutations impliqués étant énorme, je vous présenterai sommairement les grands groupes de maladies neuro-musculaires avant de me focaliser sur la **myopathie centronucléaire liée au chromosome X (XLCNM)** et le **syndrome de Charcot-Marie-Tooth type 4B (CMT4B)**.

### **1. Les myopathies**

Les myopathies représentent un sous-groupe des maladies neuro-musculaires et regroupent un ensemble de pathologies affectant le muscle. Ces pathologies sont essentiellement d'origine génétique et comprennent :

- les **dystrophies musculaires** (altération primaire et destruction progressive des fibres musculaires)
- les **myopathies congénitales** (anomalie de la mise en place et/ou de la maturation des fibres au cours du développement du fœtus)
- les **myopathies métaboliques secondaires** (dysfonctionnement de la voie de dégradation des sucres, du métabolisme des graisses ou de la chaîne respiratoire mitochondriale).

Prises une à une, la plupart de ces maladies sont considérées comme des maladies rares, avec une prévalence comprises entre 1/2 000 et 1/100 000 (même si les fréquences peuvent varier selon le pays). Toutefois, prises dans leur ensemble, les myopathies sont beaucoup plus répandues et constituent sans doute l'une des principales maladies génétiques en France. La myopathie de Duchenne, certainement la plus connue du grand public, est causée par des mutations récessives dans le gène DMD codant pour la dystrophine, localisé sur le chromosome sexuel X. De plus, plusieurs dizaines de myopathies ont été identifiées et les mutations décrites touchent un grand nombre de gènes, avec parfois plusieurs centaines de mutations différentes par gène. La grande hétérogénéité des gènes impliqués rend souvent l'identification de la mutation délicate.

## 2. Les syndromes de Charcot-Marie-Tooth

Le syndrome de Charcot-Marie-Tooth (CMT) a été nommé d'après les trois médecins qui ont décrit cette maladie en 1886 (Charcot and Marie, 1886; Tooth, 1886). Il regroupe un ensemble de pathologies neurologiques affectant le système nerveux périphérique et dont la prévalence est d'environ 1/2 500 (Saporta et al., 2011). Ces maladies sont également nommées neuropathies sensitivo-motrices héréditaires (HMSN pour « hereditary motor and sensory neuropathy »). Elles sont responsables de faiblesses musculaires, de pertes de sensation, d'atrophie musculaire et sont pour la plupart progressives. Ces maladies touchent aussi bien les neurones moteurs ou sensoriels que les cellules de Schwann. A ce jour, une trentaine de gènes a été identifiée comme étant responsable de ce syndrome (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Home/IPN.cfm>) (Figure 4). Il existe 5 sous-groupes de CMT (CMT1-2,4, AR-CMT2 et CMTX) basés sur les caractéristiques cliniques (cellules touchées), la localisation de l'allèle dans le génome (autosomal, gonosomal) et le mode de transmission (dominant, récessif). Chaque sous-groupe comporte également des subdivisions selon le gène impliqué (ex. CMT4B).

- CMT1 : regroupe les CMT pour lesquels la **gaine de myéline** est affectée : démyélinisation ou repliements anormaux autour des axones. Les CMT1 sont le plus souvent **autosomaux dominants**. Il s'agit également du syndrome CMT le plus fréquent dans la population.
  - subdivisions : CMT1A, CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1E, CMT1F
  
- CMT2 : regroupe les CMT portant atteinte à l'**intégrité des axones**, réduisant parfois la vitesse de conduction de l'influx nerveux. Ce sous-groupe ne présente pas (ou peu) d'altération de la gaine de myéline. Il est **autosomal dominant**.
  - subdivisions : CMT2A, CMT2B1, CMT2B1, CMT2C, CMT2D, CMT2E, CMT2F, ...
  
- AR-CMT2 : ce sous-groupe est **autosomal récessif** et affecte peu de patients en comparaison aux CMT1 et CMT2. Il s'agit généralement d'une atteinte au niveau des axones.



**Marie-Tooth type 4B1** (CMT4B1) seront discutés avec plus de détails en raison des mutations génétiques à l'origine du développement de ces deux pathologies musculaires distinctes.

### 3. *Les gènes impliqués dans des maladies musculaires*

Comme exposé précédemment, de nombreux gènes ont été identifiés comme étant responsables de différents types de maladies musculaires ou neuro-musculaires lorsqu'ils sont mutés. Ces gènes peuvent coder pour des protéines de fonctions très différentes :

- rôle dans l'architecture du cytosquelette (ex. dystrophine, actine)
- rôle dans la formation et la scission des vésicules d'endocytose (ex. dynamine 2)
- rôle dans l'adhésion cellulaire (ex. contactine 1)
- rôle dans l'assemblage des myofibrilles (ex. myotiline)
- rôle dans la fonction mitochondriale (ex. NADH déshydrogénase)
- rôle dans le métabolisme énergétique (ex. monocarboxylic acid transporter 1)
- rôle dans des voies de signalisation (ex. dystrophia myotonica-protein kinase)
- rôle dans le métabolisme des lipides membranaires (ex. myotubularin 1)

Au laboratoire, nous nous intéressons au trafic membranaire impliquant une signalisation lipidique par les phosphoinositides. Nous essayons de comprendre les différentes étapes et d'identifier les différents effecteurs impliqués dans 1) l'internalisation de molécules de la membrane plasmique par endocytose, 2) le trafic entre l'appareil de Golgi et la vacuole/lysosome ainsi que 3) le tri des protéines au niveau des endosomes tardifs ou corps multivésiculaires (MVB). Ceci nous a donc tout naturellement conduits à nous pencher sur la **myopathie centronucléaire liée au chromosome X (XLCNM)**, ainsi qu'au **syndrome de Charcot-Marie-Tooth type 4B1 (CMT4B1)**. En effet, dans ces pathologies humaines distinctes, deux gènes codant pour des phosphatases à phosphoinositides appartenant à la famille des myotubularines sont mutés. Or la régulation des phosphoinositides joue un rôle primordial dans de nombreux processus cellulaires : la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'autophagie, la régulation de voies de signalisation ou le trafic intracellulaire.



## **B. La myopathie centronucléaire liée au chromosome X (XLCNM)**

### **1. Le gène impliqué**

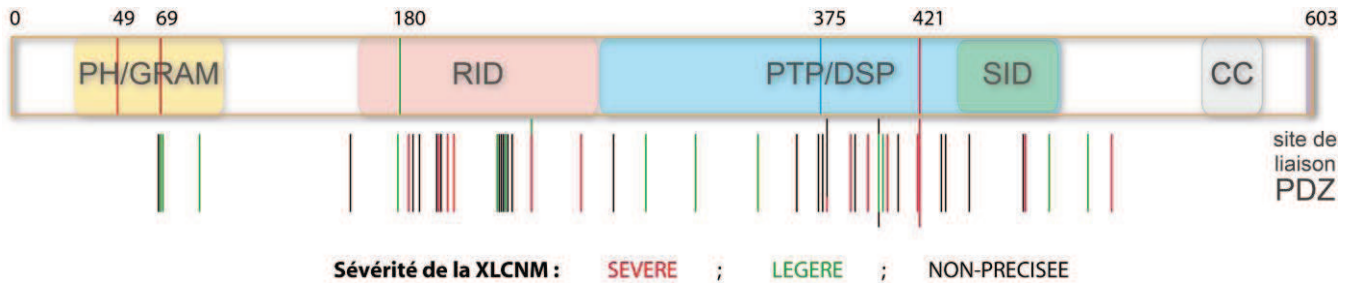
La **Myopathie Centronucléaire liée au Chromosome X** (XLCNM, **X**-linked **c**entronnuclear **m**yo**p**athy) ou Myopathie congénitale myobulaire (XLMTM, **X**-linked **m**yo**t**ubular **m**yo**p**athy) a été décrite pour la première fois en 1966 par Spiro et collaborateurs sous le nom de myopathie myotubulaire (Spiro et al., 1966). En 1967, cette maladie sera aussi décrite sous le nom de myopathie centronucléaire (Sher et al., 1967). Elle est causée par des mutations dans le gène *MTMI* codant pour une phosphatase à phosphoinositides (Online Mendelian Inheritance in Man OMIM ID #310400). Le gène responsable de la pathologie a été localisé sur le chromosome Xq28 (Thomas et al., 1990) et identifié pour la première fois par Jocelyn Laporte et col. en 1996 (Laporte et al., 1996) *MTMI* s'étend sur 104 570 paires de bases et compte 15 exons (Laporte et al., 1997). *MTMI* est exprimé de manière ubiquitaire. Ainsi un transcrit de 3.9 kb a pu être détecté dans le cœur, le cerveau, le placenta, le poumon, le foie, le muscle squelettique, les reins, le pancréas, la rate, le thymus, la prostate, les testicules, les ovaires, les intestins, le colon et le sang (Laporte et al., 1998; Laporte et al., 1996). De manière intéressante, seul le muscle squelettique et les testicules présentent un second transcrit de 2.4 kb. Toutefois, cette différence de 1.5kb ne s'explique que par l'utilisation d'un signal de polyadénylation différent et résultant en un second transcrit plus court. Aucun exon spécifique du muscle n'a pu être mis en évidence (Laporte et al., 1996).

A ce jour, plusieurs centaines de mutations ont été identifiées dans le gène *MTMI* conduisant à des formes plus ou moins sévères de XLCNM (Biancalana et al., 2003; Buj-Bello et al., 1999; de Gouyon et al., 1997; Fidani et al., 2011; Hedberg et al., 2011; Herman et al., 2002; Laporte et al., 1997; Tsai et al., 2005; Zanolini et al., 2005). La majorité des mutations sont non-sens ou induisent un décalage du cadre de lecture et aboutissent à l'absence de *MTMI* ou à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle. Des mutations ponctuelles faux-sens ont également été rapportées chez des patients présentant des signes de XLCNM (Tableau Annexe 1). Selon la nature de la mutation faux-sens, plusieurs degrés de sévérité de la maladie ont pu être observés. De plus, si l'on se rapporte aux modifications prédites au niveau de la protéine, on constate que la XLCNM est causée par des mutations faux-sens dans plusieurs domaines tout le long de la protéine. Sans parler de points chauds (« hotspots ») de mutations, il y a pourtant une prédominance de mutations dans les



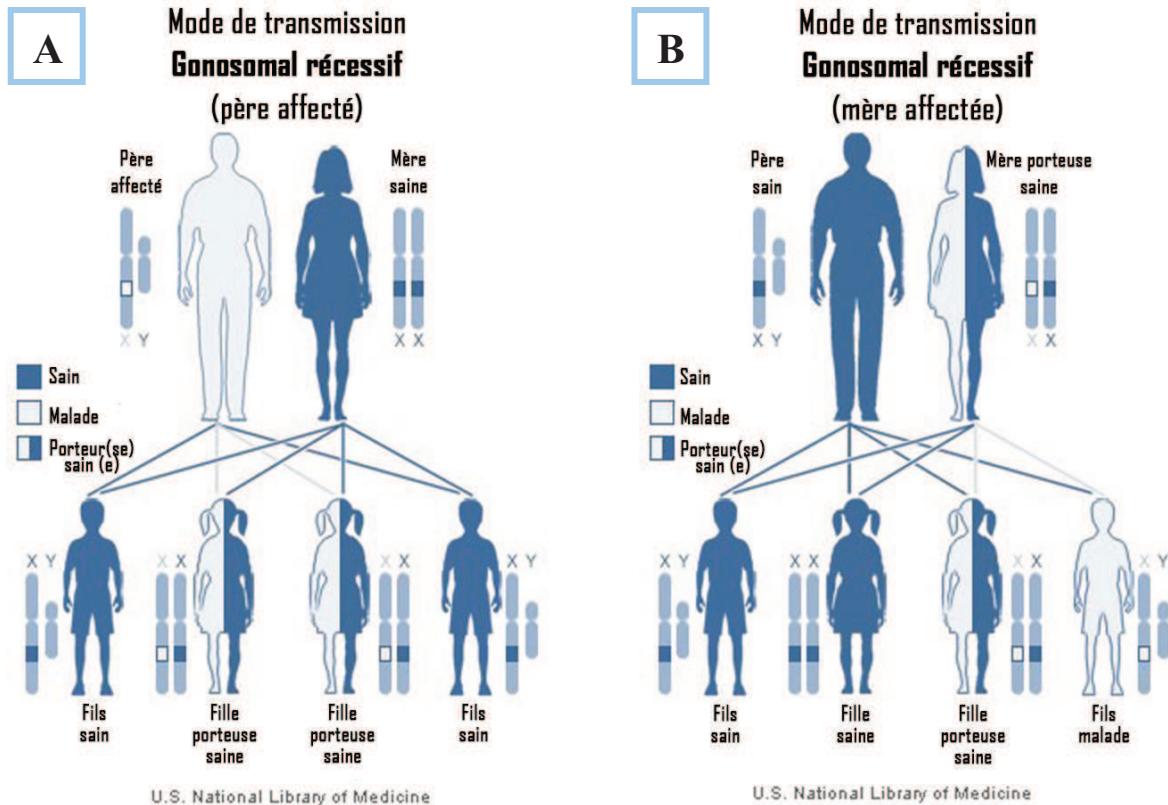
## Partie I : Introduction - La myopathie centronucléaire liée au chromosome X (XLCNM)

domaines RID (Rac1-Induced localization to membrane ruffles Domain) et PTP/DSP (Protein Tyrosine Phosphatases and Dual Specificity Phosphatases) (Laporte et al., 2003) (Figure 5). De plus, de nombreuses mutations responsables de XLCNM touchent des résidus extrêmement conservés au cours de l'évolution, suggérant que ces résidus seraient importants dans la fonction cellulaire de MTM1.



**Figure 5 : Mutations faux-sens détectées dans MTM1 humain.** Chaque barre située sous la représentation de la protéine MTM1 correspond à une mutation faux-sens répertoriée sur <http://www.uniprot.org/uniprot/Q13496>. Les acides aminés en position 49, 69, 180, 375 et 421 (représentées sur la protéine) font l'objet d'une attention particulière dans cette étude.

Bien que les mutations de *MTM1* soient récessives, elles conduisent à des myopathies quasi-exclusivement chez les nouveau-nés de sexe masculin pour des raisons évidentes dues au mode de transmission lié au chromosome sexuel X (Figure 6). Ainsi, dans presque 90% des cas, des analyses génétiques ont montré que la mère, très souvent asymptomatique, transmettait la mutation (Herman et al., 2002). Le fait que les garçons affectés ne survivent en général rarement plus d'un an réduit la possibilité d'une transmission par le père.



**Figure 6 : Mode de transmission lié au chromosome X du gène MTM1 muté.** Deux cas de figures : **A)** cas d'une famille où le père est porteur de la mutation (dans le cas de forme légère de XLMTM), **B)** cas le plus fréquent de transmission par la mère porteuse asymptomatique. *Figure adaptée de U.S. National Library of Medicine.*

## 2. Les manifestations cliniques

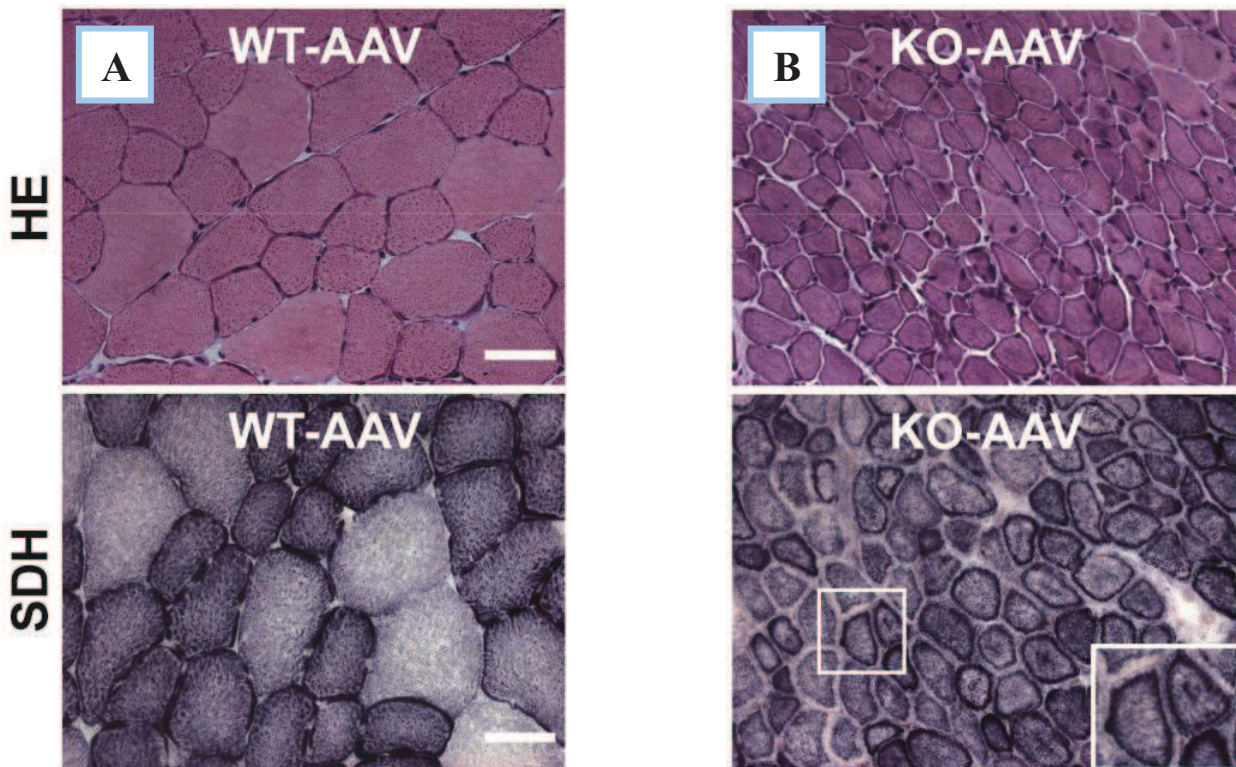
La première caractérisation de la myopathie centronucléaire liée au chromosome X date de 1966 et l'étude clinique d'un adolescent présentant une faiblesse musculaire généralisée dès la naissance, une ophtalmoplégie et des signes de ptoses (Spiro et al., 1966). Ce garçon de 12 ans présentait des difficultés à marcher et à se relever à partir d'une position accroupie. Les biopsies musculaires ont montré des signes caractéristiques de muscles immatures. C'est pourquoi la pathologie a été nommée « myopathie **myotubulaire** » en raison de la similarité entre les muscles de l'adolescent et les **myotubes**, des syncytiums formés par la fusion de plusieurs myoblastes. Les myotubes constituant un stade de différenciation des myoblastes vers les fibres musculaires matures, il a alors été proposé que la maladie était le résultat d'un défaut dans la maturation des fibres musculaires. Cette proposition a été renforcée par la détection dans le muscle de patients atteints de XLCNM de protéines (la vimentine et la forme embryonnaire de la chaîne lourde de la myosine) qui ne sont normalement exprimées que dans les myotubes fœtaux (Sarnat, 1990; Sawchak et al., 1991).

Néanmoins l'étude de souris *Mtm1* KO tend à montrer qu'il s'agit en réalité d'un défaut de maintien des fibres musculaires dans un état mature. En effet, les souriceaux *Mtm1* KO ne commencent à développer des signes de XLCNM qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine suivant la naissance et meurent prématurément entre 6 et 14 semaines en manifestant des signes **généralisés** et **progressifs** de XLCNM (Buj-Bello et al., 2002). Cette nouvelle hypothèse est également validée chez les patients atteints de XLCNM car la présence de marqueurs immature n'est pas une constante dans les cas de XLCNM (Soussi-Yanicostas et al., 1991).

La XLCNM se caractérise par une hypotonie musculaire généralisée et une faiblesse respiratoire. Dans ses formes les plus sévères, la XLCNM conduit à une mort néonatale due à une insuffisance respiratoire. Durant la grossesse, la mère présente souvent des signes d'hydramnios accompagnés de mouvements faibles ou très rares du fœtus conduisant à des fausses-couches ou une mortinatalité.

### **3. *Les caractéristiques histologiques***

Les fibres musculaires résultent d'un processus de fusion de plusieurs myoblastes. Les fibres musculaires sont donc des cellules plurinucléées. Dans un muscle sain, les noyaux cellulaires sont localisés en périphérie de la fibre, adjacent à la membrane plasmique. L'analyse de biopsies de muscles de patients atteints de XLCNM a montré la présence de noyaux centraux, d'où la dénomination de myopathie « **centronucléaire** ». Le noyau central est en général entouré d'un halo dépourvu d'éléments contractiles mais contenant des agrégats de mitochondries et des granules de glycogène (Sarnat et al., 1981). L'analyse microscopique de biopsie en coloration H&E (Hématoxyline & Eosine) permet de visualiser ce trait caractéristique des myopathies centronucléaires (Jungbluth et al., 2008). Une coloration de la succinate déshydrogénase (SDH) par le NBT (Nitro Bleu Tetrazolium) montre également des motifs caractéristiques de XLCNM. Ce colorant marque les fibres musculaires de type I (à contraction lente, à forte activité oxydative) en bleu marine. Les fibres musculaires à faible capacité oxydative seront colorées en bleu clair (Figure 7).



**Figure 7 : Coloration de fibres musculaires de souris.** A) Fibres musculaires de souris sauvages, B) Fibres musculaires de souris *mtm1*-KO. Coloration Hématoxilline/Eosine (H&E, panneaux supérieurs) et Succinate Déshydrogénase (SDH, panneaux inférieurs). *Figure adaptée de Amosii et al. (en révision)*

Une autre particularité de XLCNM consiste en la formation d'un anneau basophile entourant la fibre musculaire et situé sous le sarcolemme. L'analyse ultra-structurale a montré que les anneaux étaient constitués de myofibrilles de petit diamètre orientés de manière oblique et entourés de mitochondries, de réticulum sarcoplasmique et de granules de glycogène (Bevilacqua et al., 2009).

## C. Le Syndrome de Charcot-Marie-Tooth type 4B (CMT4B)

### 1. *Les gènes impliqués*

Le syndrome de Charcot-Marie-Tooth de type 4B1 a été attribué à des mutations dans le gène *MTMR2* codant pour la Myotubularin-Related protein 2 (OMIM ID#601382). Le gène est situé sur le chromosome 11q22, s'étend sur 91 328 paires de bases et compte 18 exons. *MTMR2* est exprimé de manière ubiquitaire (Berger et al., 2002; Bolino et al., 2000; Houlden et al., 2001; Laporte et al., 1998).

De la même manière que *MTM1*, la majorité des mutations identifiées chez des patients a pour conséquence la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle. Les analyses montrent que ceci provient soit de mutations non-sens, soit d'insertions induisant un décalage du cadre de lecture. Dans les deux cas, il est prédit qu'un codon « stop » prématuré apparaît dans l'ARNm de *MTMR2* (Bolino et al., 2000).

En revanche, contrairement à *MTM1*, l'hérédité de la pathologie suit un schéma de transmission autosomal récessif (Figure 8). Dans ce cas de figure, le risque d'avoir un enfant atteint de CMT4B n'est réel que lorsque les deux parents sont hétérozygotes pour le gène *MTMR2*.

### 2. *Les manifestations cliniques*

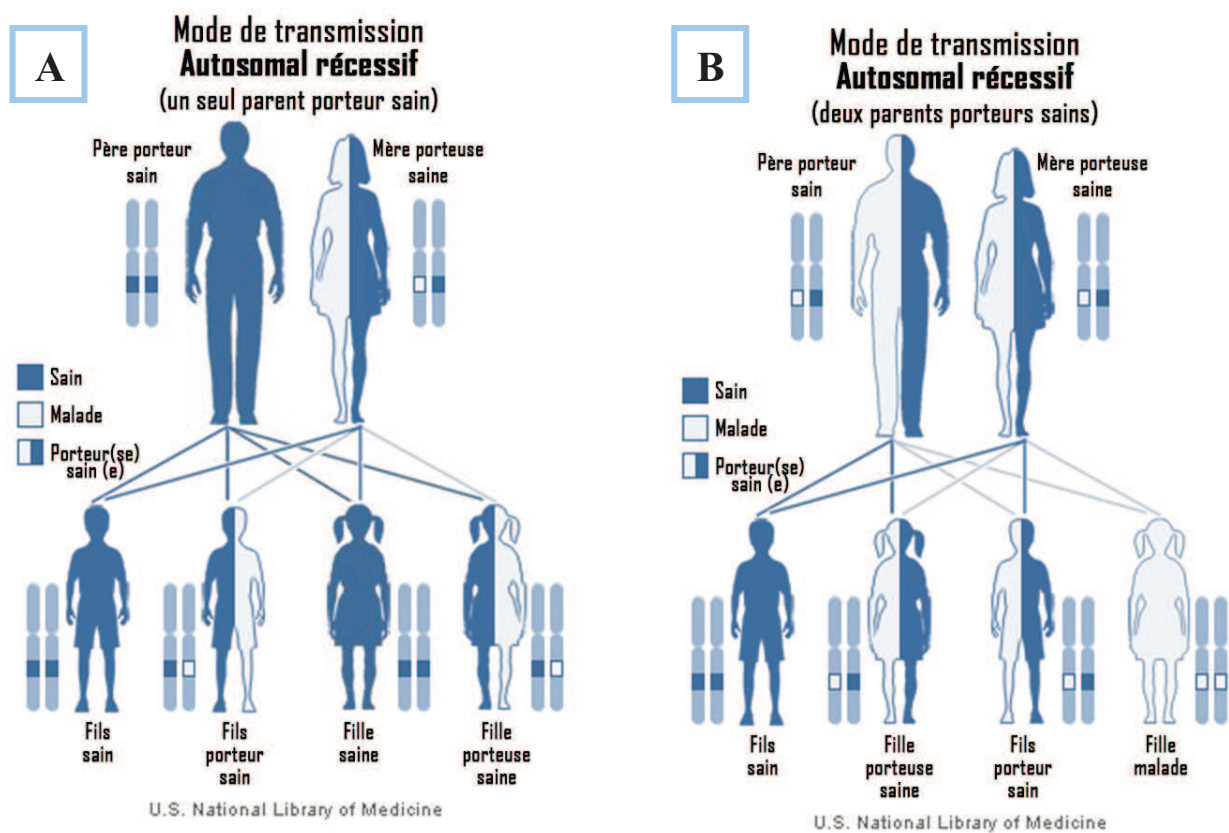
Le syndrome de Charcot-Marie-Tooth se manifeste par des faiblesses musculaires distales et proximales des membres inférieurs. Les patients développent très souvent un pied varus équin durant l'enfance (pes equinovarus, congenital talipes equinovarus (CTEV) ou club foot) ainsi que des faiblesses ou des mouvements involontaires des muscles faciaux. Les capacités cognitives ne sont pas affectées. La progression de la pathologie autorise rarement une espérance de vie de plus de 50 ans (Quattrone et al., 1996). La pathologie s'accompagne de vitesses de conduction nerveuse réduites.

### 3. *Les caractéristiques histologiques*

Contrairement à la XLCNM pour laquelle les cellules musculaires sont affectées, le syndrome CMT4B touche le système nerveux périphérique et plus particulièrement les **cellules de Schwann**. La coïncidence veut que ce soit ce même **Théodore Schwann**, évoqué

en tout début d'introduction et à l'origine de la découverte de la nature vivante de *S. cerevisiae*, qui ait donné son nom à ce type cellulaire du système nerveux impliqué dans le syndrome CMT4B1.

L'analyse en coupes minces de tissus nerveux, tels que des nerfs sciatiques, montre des anomalies dans la gaine de myéline autour des axones : démyélinisation, absence de fibres myélinisées, hypomyélinisation et repliements anormaux de la gaine de myéline (Quattrone et al., 1996).



**Figure 8 : Mode de transmission autosomal récessif du gène MTMR2 muté.** Deux cas de figures : **A)** cas d'une famille où un seul parent est porteur de la mutation (asymptomatique), **B)** cas où les deux parents sont porteurs asymptomatiques de la mutation. *Figure adaptée de U.S. National Library of Medicine.*

## D. Diagnostiques, traitements et difficultés

### 1. La myopathie XLCNM

Une approche consiste à détecter les niveaux de production de MTM1. En effet, certaines mutations faux-sens responsables de formes sévères de XLMTM sont à l'origine d'une diminution de la production de MTM1 (Laporte et al., 2001; Tosch et al., 2010).

L'origine génétique des myopathies rend la guérison impossible à l'heure actuelle et il n'existe aujourd'hui aucune thérapie efficace pour soigner ces pathologies.

Néanmoins, plusieurs approches ont été testées pour d'autres types de myopathies, essentiellement pour la dystrophie de Duchenne, laissant entrevoir un bon espoir de traitement efficace (Partridge, 2011). Il faudra toutefois attendre quelques années encore avant de voir ce type de traitement apparaître dans nos hôpitaux. De plus, l'approche la plus prometteuse (à mon sens) dite de « l'exon skipping », expérimentée pour la myopathie de Duchenne, ne peut s'appliquer que dans des cas bien précis, lorsque la mutation touche une région de la protéine non essentielle pour sa fonction (Aartsma-Rus, 2012; Adkin et al., 2011). Un « avantage » de la myopathie de Duchenne est qu'elle se manifeste chez l'enfant vers 2 à 3 ans et progresse tout le long du développement du patient, lequel perd en général la capacité de marcher aux alentours de 12 ans. Un traitement sur une durée longue, capable de renverser cette dégénérescence est par conséquent envisageable.

En revanche, pour la XLCNM, des mutations dans *MTM1* sont très souvent responsables d'un décès précoce, à la naissance ou dans les mois suivants la naissance. Il est donc difficile dans ces conditions d'envisager un traitement suffisamment efficace et rapide pour soigner le nouveau-né. De plus, les mécanismes à l'origine de la pathologie ainsi que les raisons de la spécificité musculaire de MTM1 sont encore très mal compris. Ainsi, envisager un traitement sans comprendre les processus primitifs causant la XLCNM est selon moi plutôt audacieux.

## **2. La neuropathie CMT4B1**

Concernant le syndrome de Charcot-Marie-Tooth 4B1 et les mutations dans MTMR2, la chronologie de la pathologie (apparition des premiers symptômes, progression sur plusieurs années) est plus propice à la possibilité de traitement. Cependant, il n'existe aucune thérapie spécifique à l'heure actuelle pour traiter ces maladies. Selon la sévérité de la maladie, il est possible, dans une certaine mesure, de traiter les symptômes afin d'améliorer le confort du patient. L'essentiel des moyens mis en œuvre pour soigner les syndromes CMT sont d'ordre orthopédique, en équipant le malade d'orthèses ou d'attelles pour améliorer la mobilité et la marche mais également pour prévenir d'éventuelles blessures (chutes, foulures).



### III. Le métabolisme des phosphoinositides membranaires

#### A. Les lipides, constituants majoritaires des membranes

Il est indispensable de garder à l'esprit que les membranes ne sont pas des structures figées et que leur dynamique et leurs propriétés physicochimiques font partie des facteurs ayant permis l'apparition de la vie.

En effet, l'environnement, au sens large, échappe bien souvent à la stabilité. Les variations de température, d'humidité, de pH, d'ensoleillement, de pression osmotique ou de source d'énergie sont autant de facteurs contre lesquels tout organisme vivant doit lutter constamment afin de conserver un équilibre. C'est pour gagner en stabilité face à toutes ces fluctuations incontrôlables que la cellule s'est organisée de façon à limiter les variations intracellulaires, en s'isolant partiellement du « bouillon capricieux » qui l'entoure en permanence. La **membrane plasmique** est le premier rempart permettant de séparer le milieu extérieur du cytoplasme. Sa composition lui assure une protection mécanique et un contrôle des échanges avec l'extérieur grâce à une perméabilité très sélective.

La membrane plasmique s'organise en deux feuilletts de phospholipides, la **bicouche**, dans laquelle peuvent s'enchâsser macromolécules protéiques, stérols et glycolipides. Les phospholipides qui constituent la bicouche sont dits « **amphiphiles** » car ils possèdent à la fois un groupe hydrophile (tête) et un groupe hydrophobe (queue). Au sein de la bicouche, les groupes hydrophobes se font face, générant un espace hydrophobe entre les deux feuilletts membranaires. Cette propriété est très importante pour l'ancrage dans les membranes de certaines molécules lipidiques ou protéiques, telles que les canaux ioniques, les récepteurs ou les protéines transmembranaires. La composition en lipides des membranes peut varier selon les organismes (eucaryotes ou procaryotes), les types cellulaires (au sein des tissus d'un même organisme pluricellulaire), le type de membrane (plasmique, réticulum endoplasmique, endosomes, Golgi, mitochondries et autres compartiments intracellulaires) et même l'état de la cellule (au repos ou en réponse à un stress / stimulus) (Fujiki et al., 1982; Spector and Yorek, 1985; Zinser et al., 1991).

La membrane est composée principalement de cinq phospholipides : la **phosphatidylcholine** (PC), la **phosphatidyléthanolamine** (PE), la **phosphatidylsérine** (PS), le **phosphatidylinositol** (PtdIns) et la **sphingomyéline** (SM). Le cholestérol, bien que présent

dans les membranes cellulaires, ne forme pas la membrane par lui-même mais module sa fluidité membranaire. Cette fluidité est par ailleurs essentielles puisqu'elle autorise la diffusion latérales des molécules sur la surface du feuillet membranaire. Le double feuillet lipidique de la membrane plasmique permet également une distribution asymétrique des phospholipides au sein des feuillets internes et externes. Il existe également des événements de diffusion verticale (entre deux feuillets), ou « flip-flop » même s'ils sont plus rares.

Si la membrane plasmique joue un rôle essentiel de barrière sélective, on retrouve dans les cellules eucaryotes d'autres structures membranaires intracellulaires telles que le noyau, les organites et les vésicules de transport. L'organisation de ces membranes ainsi que leur composition diffère selon la nature de l'organite (Fujiki et al., 1982). En effet, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, le lysosome (vacuole chez les champignons), les endosomes, les péroxisomes et les vésicules de transport sont entourés d'une seule **bicouche lipidique**. L'espace à l'intérieur de ces compartiments intracellulaires est nommé « lumen » ou « lumière ». En revanche, le noyau, les mitochondries, les chloroplastes (pour les végétaux chlorophylliens) et les vésicules autophagiques sont délimités par une **double bicouche lipidique**.

Chacun de ces compartiments intracellulaires doit s'acquitter de fonctions bien précises pour la survie de la cellule (Spector and Yorek, 1985). Cette dernière doit donc être capable de chorégraphier le transport de vésicule et de protéines de manière spatio-temporelle en sein de ces différents compartiments. Il est par conséquent indispensable pour la cellule de pouvoir discriminer un compartiment intracellulaire d'un autre. Ceci passe par l'attribution d'une identité propre à chacun des organites allant même jusqu'à distinguer les faces « cis » des faces « trans », notamment pour l'appareil de Golgi.

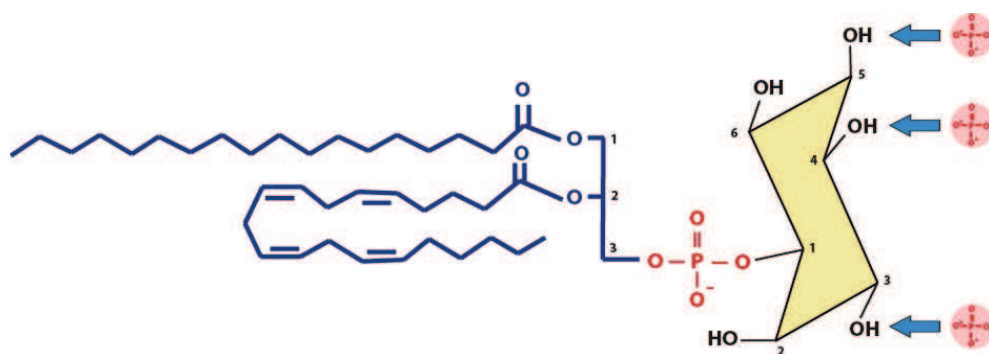
Ces « cartes d'identité » propres à chaque compartiment intracellulaire sont essentiellement définies par les molécules tapissant le feuillet **cytoplasmique** des membranes. Parmi ces molécules, les lipides membranaires, et plus particulièrement le **phosphatidylinositol (PtdIns)** et les **polyphosphoinositides (PPIIn)**, jouent un rôle majeur dans la régulation spatio-temporelle de différents processus cellulaires tels que la dynamique du cytosquelette, le trafic membranaire, la prolifération et la survie cellulaire.

## B. Les PPIIn, des médiateurs essentiels

Les **polyphosphoinositides**, ou **PPIIn**, sont des constituants mineurs des membranes cellulaires. Ils représentent moins de 10% des phospholipides cellulaires. Les PPIIn sont composés d'une molécule de glycérol estérifiée en position SN1 et SN2 par deux chaînes d'acides gras et reliée en position SN3 à un anneau inositol par l'intermédiaire d'une liaison phosphate (Figure 9) (Payraastre et al., 2001).

L'anneau inositol des PPIIn est un polyol de cyclohexane pouvant être phosphorylé en position D3, D4 et/ou D5. A ce jour, aucune étude n'a jamais rapporté de phosphorylations en position D2 ou D6 de l'anneau inositol. Il est très peu probable que de telles molécules existent pour des raisons d'encombrement stérique. Ainsi la phosphorylation du phosphatidylinositol (**PtdIns**) peut potentiellement générer jusqu'à sept PPIIn différents (Figure 9) :

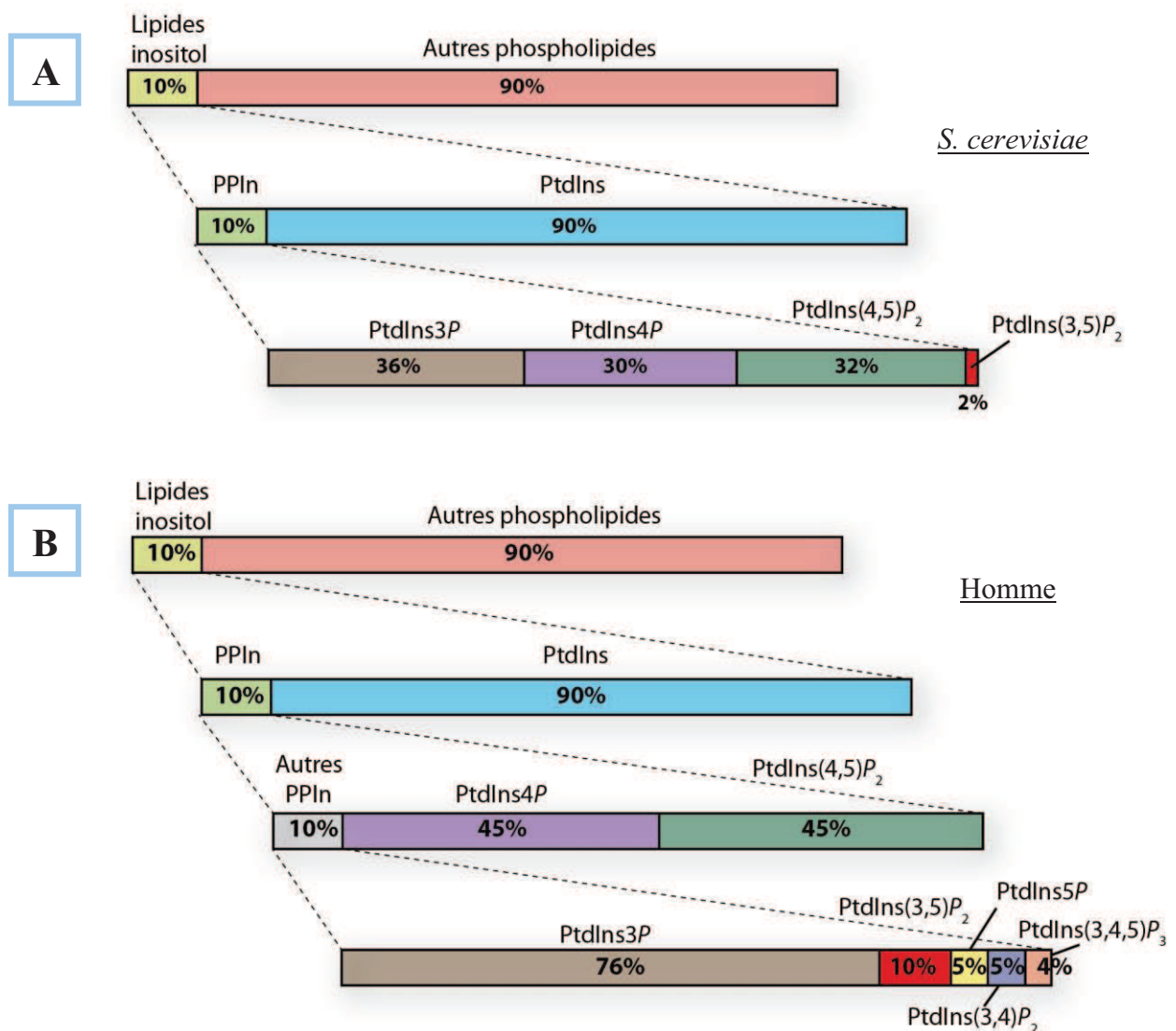
- le phosphatidylinositol 3-phosphate (**PtdIns3P**)
- le phosphatidylinositol 4-phosphate (**PtdIns4P**)
- le phosphatidylinositol 5-phosphate (**PtdIns5P**)
- le phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (**PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>**)
- le phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (**PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>**)
- le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (**PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>**)
- le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (**PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>**)



**Figure 9 : Le phosphatidylinositol (PtdIns).** En bleu, le glycérol estérifié par des acides gras en position SN1 et SN2. En rouge (au centre), le groupement phosphate faisant le lien entre le glycérol et l'anneau inositol. Les flèches indiquent les positions D3, D4 et D5 phosphorylables.

Par soucis de clarté, j'aimerais insister sur la définition des « **PPIIn** » et sur la manière dont j'utiliserai ce terme dans ce manuscrit : les polyphosphoinositides (**PPIIn**) sont au nombre de sept et correspondent à des phosphatidylinositol mono-, bis- ou trisphosphates. **Le PtdIns ne sera pas considéré comme un PPIIn mais bien comme un précurseur des PPIIn. J'utiliserai le terme « inositol-glycérophospholipides » (IGP) pour désigner l'ensemble « PtdIns + les sept PPIIn ».**

Les sept PPIIn sont présents en quantité variable (Figure 10) dans les cellules et certaines espèces sont enrichies dans des compartiments intracellulaires bien précis. Les PPIIn jouent un rôle essentiel dans l'identité des membranes intracellulaires (Payraastre et al., 2001).



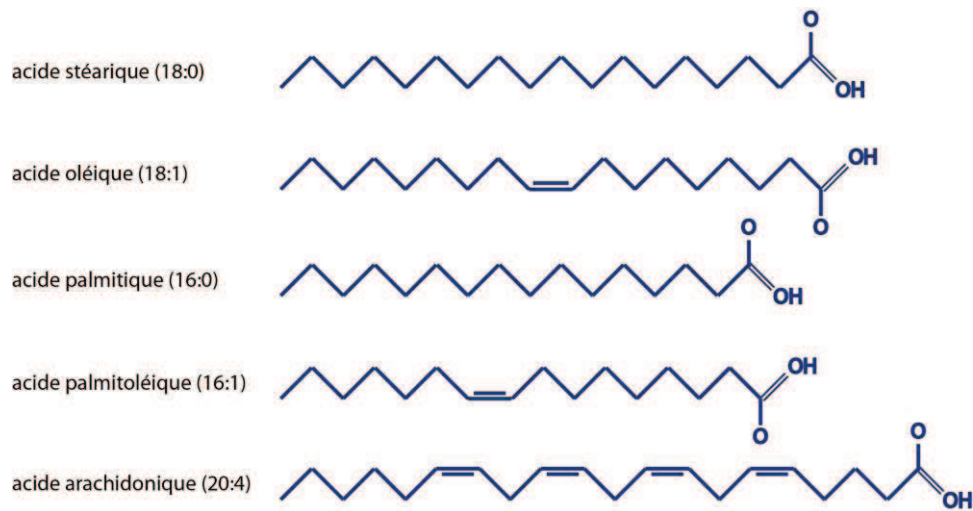
**Figure 10 : Quantités relatives des différents PPIIn chez A) *Saccharomyces cerevisiae* et B) chez l'Homme. D'après les données collectées de (Liu and Bankaitis, 2010; Parrish et al., 2004; Pettitt et al., 2006; Rameh and Cantley, 1999; Roth, 2004).**

Les PPIIn sont tous virtuellement interconvertibles sous réserve que l'organisme possède le jeu d'enzymes approprié. Ainsi, le PtdIns5P, le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> et le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, présents chez les mammifères, n'ont pu être mis en évidence dans une levure *S. cerevisiae* sauvage.

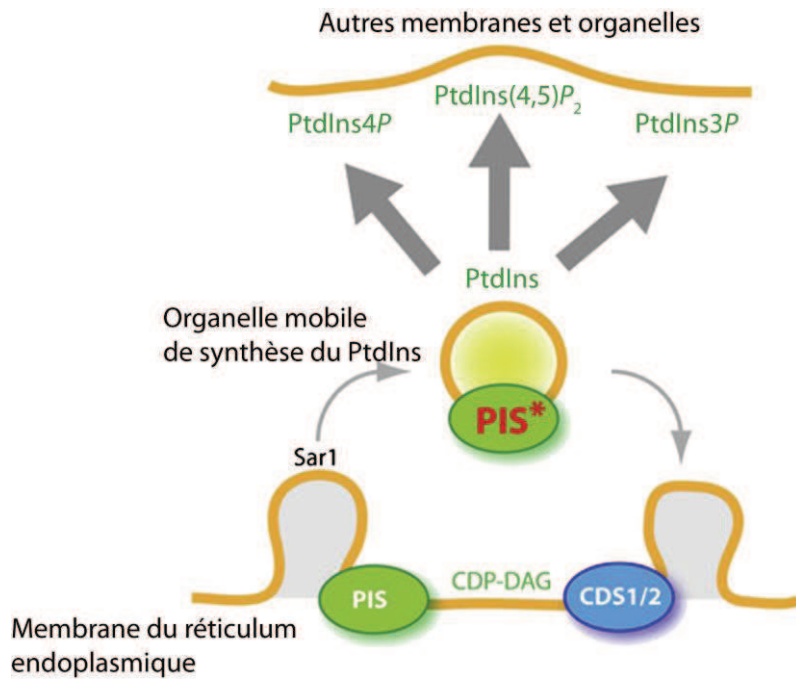
Chez l'humain, les acides gras les plus courants dans le phosphatidylinositol sont l'acide stéarique (18:0) en position SN1 et l'acide arachidonique (20:4) en SN2 (Marcus et al., 1969; Mauco et al., 1984). Chez *S. cerevisiae*, la nature des acides gras est légèrement différente ; on retrouve ainsi une majorité d'acide oléique (18:1), d'acide palmitoléique (16:1) et d'acide palmitique (16:0) (Pettitt et al., 2006; Trevelyan, 1966) (Figure 11). Etant donné que les diverses espèces de PPIIn dérivent du PtdIns, on estime que leurs compositions en acides gras des PPIIn d'un organisme sont les mêmes que le PtdIns de l'organisme en question.

Les PPIIn sont des phospholipides minoritaires au sein des membranes. En effet, les PPIIn représentent environ 10-15% des phospholipides membranaires totaux. Ainsi depuis 1953, date à laquelle Lowel et Mabel Hokin ont détecté les phosphoinositides grâce à un marquage métabolique au <sup>32</sup>P (Hokin and Hokin, 1953), ces lipides ont pris une grande place en recherche (Parker, 2004). En effet, malgré leur faible proportion, les PPIIn jouent un rôle essentiel dans le recrutement et/ou l'activation de protéines effectrices. **De plus, des changements locaux dans les niveaux de PPIIn interviennent par le jeu de kinases et phosphatases au sein de membranes distinctes permettant alors une régulation spatiotemporelle de divers événements tels que le bourgeonnement, la fusion ou la dynamique des membranes** (Payraastre et al., 2001).

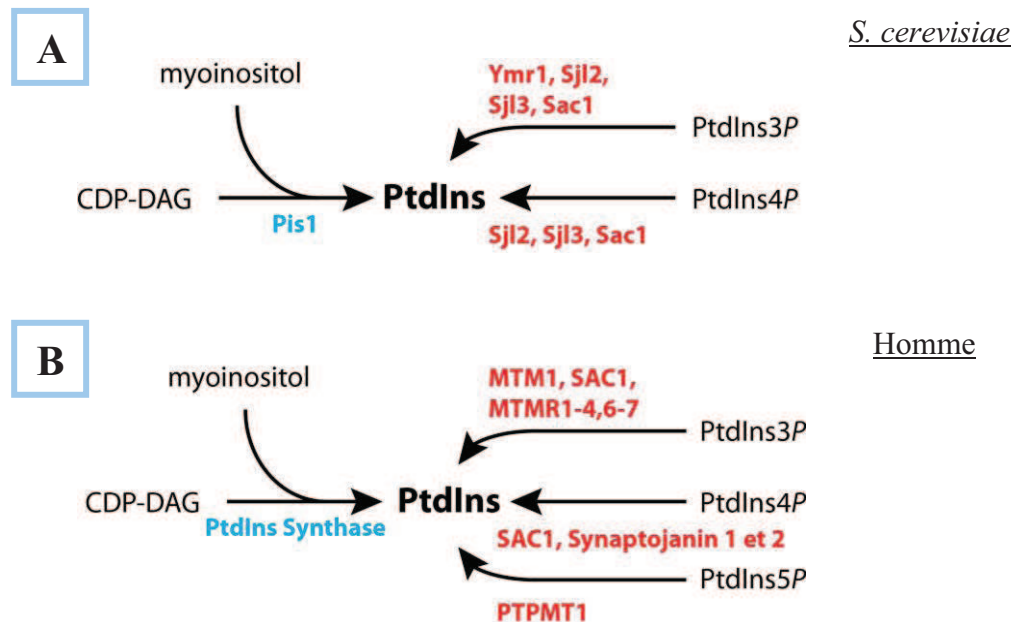
De très bonnes revues décrivant le métabolisme des PPIIn ainsi que leurs localisations et rôles intracellulaires chez l'Homme et la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont disponibles (Odorizzi et al., 2000; Strahl and Thorner, 2007; Sasaki et al., 2009; Liu and Bankaitis, 2010).



**Figure 11 : Acides gras retrouvés majoritairement dans les PPIIn.** Chez l'humain, les acides gras les plus courants dans le phosphatidylinositol sont l'acide stéarique (18:0) et l'acide arachidonique (20:4). Chez *S. cerevisiae*, on retrouve une majorité d'acide oléique (18:1), d'acide palmitoléique (16:1) et d'acide palmitique (16:0).



**Figure 12 : Schema de la voie de synthèse et du devenir du PtdIns.** La synthèse du PtdIns a lieu au niveau d'organelles mobiles dérivant du réticulum endoplasmique et à destination de différents compartiments intracellulaires. D'après (Kim et al., 2011).



**Figure 13 : Synthèse du PtdIns chez A) *S. cerevisiae* et chez B) l'humain et les enzymes impliquées.** En bleu, la PtdIns Synthase. Les phosphatases sont représentées en rouge.

## C. Voie de synthèse des polyphosphoinositides (PPIIn)

### 1. Le PtdIns, précurseur des PPIIn

#### a. Synthèse

Le phosphatidylinositol (**PtdIns**) est un phospholipide présent de manière ubiquitaire dans les cellules eucaryotes mais comparé aux autres phospholipides sa proportion varie selon le type de membrane. Il est néanmoins l'**inositol-glycérophospholipide (IGP)** le plus représenté dans la cellule, ses niveaux intracellulaires étant environ 10 fois supérieurs à ceux des deux plus abondants PPIIn, le PtdIns4P et du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> qui sont présents en quantité équivalente dans les cellules (Figure 10). Le PtdIns en addition à tous les PPIIn représentent environ 10% des phospholipides membranaires totaux (Figure 10).

Le PtdIns est le point de départ du métabolisme des PPIIn. En effet, les PPIIn sont tous métabolisés directement ou séquentiellement à partir du PtdIns (Figure 12).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le PtdIns est synthétisé par l'enzyme Pis1 (PtdIns synthase 1) au niveau de la face cytoplasmique des membranes du réticulum endoplasmique, celles de l'appareil de Golgi, de la membrane externe des mitochondries et des microsomes (Nikawa and Yamashita, 1984). Pis1 catalyse la synthèse du PtdIns à partir de CDP-DAG (Cytidine diphosphate-diacylglycérol) et du *myo-inositol* (Figure 13).

Chez l'humain, cette synthèse est catalysée par la PtdIns Synthase, un homologue de Pis1 caractérisé plus tard (Antonsson, 1994; Kim et al., 2011; Lykidis et al., 1997).

Le PtdIns est également recyclé par conversion du PtdIns3P, du PtdIns4P et du PtdIns5P en PtdIns par l'action de PtdIns 3-phosphatases, 4-phosphatases et 5-phosphatases respectivement.

Chez l'humain, les myotubularines actives (MTM1, MTMR1-4,6,7) sont des 3-phosphatases réalisant, entre autres, la conversion du PtdIns3P en PtdIns. Néanmoins d'autres phosphatases humaines sont capables d'hydrolyser le PtdIns3P en PtdIns, comme la PPIIn



phosphatase SAC1, hydrolysant également le PtdIns4P et probablement le PtdIns5P en PtdIns (Guo et al., 1999; Liu and Bankaitis, 2010; Liu et al., 2009). Les synaptojanines 1 et 2 ont également été décrites comme déphosphorylant le PtdIns4P en PtdIns. Enfin, PTPMT1, une 5-phosphatase a été identifiée comme étant une protéine ancrée dans le feuillet interne des membranes mitochondriales et réalisant *in vitro* la conversion du PtdIns5P en PtdIns (Pagliarini et al., 2004; Xiao et al., 2011).

La levure *S. cerevisiae* ne possède qu'un seul homologue de myotubularine, Ymr1, réalisant la même conversion que les myotubularines humaines, du PtdIns3P vers le PtdIns. L'activité 3-phosphatase de Ymr1 est, au moins en partie, redondante avec celle de Sjl2 et Sjl3 (Synaptojanin-like protein 1 et 2) (Parrish et al., 2004). Sjl2 et Sjl3 sont de plus capables de convertir le PtdIns4P en PtdIns.

*b. Rôle physiologique du PtdIns*

Les différentes études n'ont pas pu mettre en évidence de rôle direct du PtdIns dans les voies de signalisation. Cependant la délétion du gène *PIS1* dans la levure létale, principalement en raison du fait que le PtdIns est à l'origine de tous les PPI<sub>n</sub> intracellulaires. Son absence entraîne donc conjointement l'absence de tous ses dérivés phosphorylés.

## **2. Le PtdIns4P**

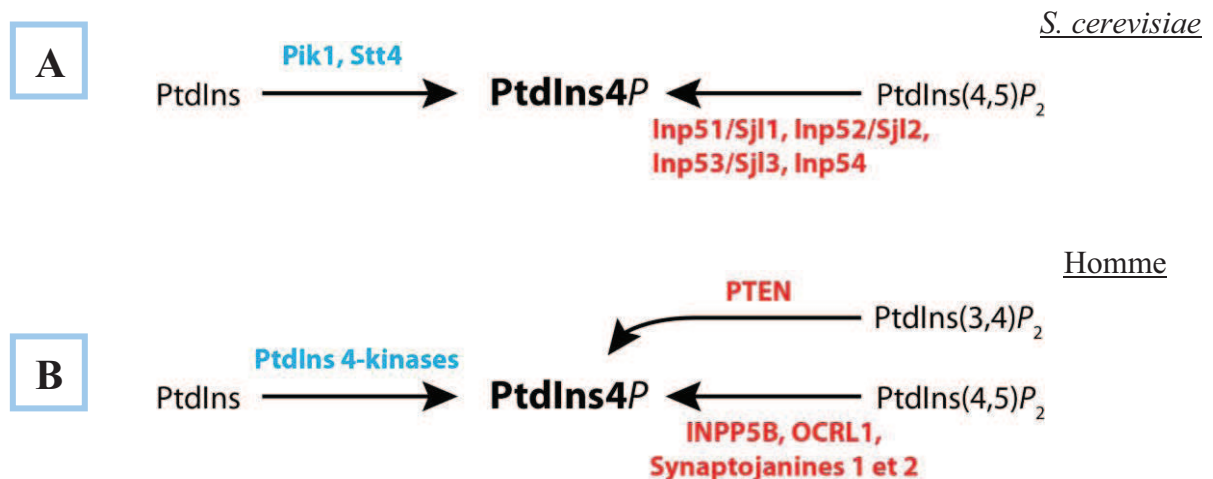
*a. Synthèse*

Chez la levure, le PtdIns4P représente environ 45 % des différents PPI<sub>n</sub> mono-phosphorylés et approximativement 30 % des PPI<sub>n</sub> totaux (Figure 10A). Chez L'Homme, il représente environ 86 % des différents PPI<sub>n</sub> mono-phosphorylés et approximativement 45 % des PPI<sub>n</sub> totaux (Figure 10B)

Le phosphatidylinositol 4-phosphate est enrichi au niveau de l'appareil de Golgi (De Matteis et al., 2002). Par conséquent, la proportion de PtdIns4P est à pondérer en considérant deux paramètres : 1) les PPI<sub>n</sub> sont présents uniquement dans le **feuillet cytoplasmique** des membranes et 2) les membranes correspondant au feuillet cytoplasmique de l'appareil de

Golgi comptent pour 7 à 12% des membranes cellulaires totales. Ainsi, si le PtdIns4P est enrichi au niveau de l'appareil de Golgi, il peut potentiellement **représenter jusqu'à plus de 5% des lipides du feuillet cytoplasmique** de l'appareil de Golgi. Cette remarque est à prendre en compte pour tous les PPI, et plus particulièrement pour ceux présents à des **niveaux très faibles lorsqu'on se rapporte aux PPI ou aux lipides cellulaires totaux**. La signalisation via les PPI est donc question de concentration au niveau du feuillet cytoplasmique d'un compartiment intracellulaire donné, voire au niveau de microdomaines (ou « lipid rafts ») membranaires.

Le PtdIns4P est majoritairement généré au niveau de l'appareil de Golgi par phosphorylation du PtdIns par des PI 4-kinases ou par déphosphorylation du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> et du PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> par des PI 5-phosphatases et des PI 3-phosphatases respectivement (Figure 14).



**Figure 14 : Synthèse du PtdIns4P et enzymes impliquées chez A) la levure *S. cerevisiae* et chez B) l'Homme.** Les kinases sont représentées en bleu, les phosphatases sont représentées en rouge.

Chez *S. cerevisiae*, les PI 4-kinases Pik1 et Stt4 réalisent la conversion du PtdIns en PtdIns4P au niveau de l'appareil de Golgi. Bien qu'elles aient la même activité kinase, la délétion de l'une ou l'autre enzyme induit une létalité. Ceci démontre que Pik1 et Stt4 ont des fonctions cellulaires distinctes qui ne sont pas compensées par l'autre enzyme (Audhya et al., 2000; Strahl et al., 2005). La localisation de Pik1 à l'appareil de Golgi dépend de Frq1, une petite protéine liant le Ca<sup>2+</sup> et stimulant l'activité de Pik1 (Hendricks et al., 1999).

La déphosphorylation du  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  en  $\text{PtdIns}4P$  est orchestrée par les 5-phosphatases Inp51/Sjl1, Inp52/Sjl2, Inp53/Sjl3 et Inp54. La PPIn 5-phosphatase Sjl1 est spécifique du  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  contrairement à Sjl2 et Sjl3 (Figure 26). De plus, la délétion du gène *SJL1* compense le défaut de croissance d'un mutant thermo-sensible *sac6*, un gène de levure codant pour la fimbrine, une protéine impliquée dans le maintien du cytosquelette d'actine et dans l'endocytose (Singer-Kruger et al., 1998). Inp54 est la quatrième PPIn 5-phosphatase de levure. A l'inverse de Sjl1, Sjl2 et Sjl3, Inp54 ne possède pas de domaine SAC impliqué dans la déphosphorylation des PPIn. En revanche Inp54 possède une extrémité C-terminale très hydrophobe responsable de l'ancrage de l'enzyme dans le feuillet cytoplasmique de la membrane du **réticulum cytoplasmique**. La délétion de *INP54* augmente de deux fois la sécrétion d'une protéine rapportrice, la BPTI (Bovine pancreatic trypsin inhibitor) (Wiradjaja et al., 2001).

Chez l'Homme, les PPIn 4-kinases  $\text{PI4K}\alpha$  et  $\text{PI4K}\beta$  vont permettre la synthèse du  $\text{PtdIns}4P$  à partir du précurseur  $\text{PtdIns}$ . Bien qu'elles soient peu décrites, une étude récente montre un lien entre ces deux kinases et les complexes de répllication du virus HCV (Hépatite C) (Reiss et al., 2011). De plus, plusieurs PPIn phosphatases peuvent également synthétiser le  $\text{PtdIns}4P$ . Par exemple, la 3-phosphatase PTEN peut convertir le  $\text{PtdIns}(3,4)P_2$  en  $\text{PtdIns}4P$  tandis que les 5-phosphatases OCRL1 (Occulocerebrorenal syndrome protein 1), INPP5B (Inositol Polyphosphate Phosphatase 5B) et les synaptojanines 1 et 2 synthétisent le  $\text{PtdIns}4P$  à partir du  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ . Des mutations dans *OCRL1* sont à l'origine du syndrome oculocérébro-rénal de Lowe (Zhang et al., 1995).

*b. Rôle physiologique du  $\text{PtdIns}4P$*

Le  $\text{PtdIns}4P$  a pendant longtemps été considéré comme un simple précurseur des autres PPIn. Chez la levure, le  $\text{PtdIns}4P$  est présent dans deux compartiments distincts : la membrane plasmique et le réseau trans-golgien.

A la membrane plasmique où il est synthétisé par Stt4, son rôle est de servir de précurseur à la synthèse du  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  (Audhya and Emr, 2002).

Le  $\text{PtdIns}4P$ , enrichi à l'appareil de Golgi, est synthétisé par Pik1. L'appareil de Golgi constitue un carrefour central dans le trafic membranaire. L'échange continu de protéines et

de membranes avec d'autres compartiments intracellulaires nécessite une régulation spatio-temporelle très précise des étapes du trafic. Le PtdIns4P serait impliqué dans le maintien l'identité de l'appareil de Golgi afin de préserver un trafic intracellulaire correct (De Matteis et al., 2002).

Ainsi, chez la levure, le PtdIns4P a été montré comme ayant une fonction dans la régulation de la sécrétion du réseau trans-Golgien et le transport rétrograde de protéines (Mayinger, 2009; Wood et al., 2009). De plus, plusieurs protéines ont été identifiées comme liant le PtdIns4P et dont la localisation à l'appareil de Golgi est dépendante de ce lipide. Par exemple, la protéine Osh1 (Oxysterol binding protein Homologue) requise pour le transport des lipides de type stérol, est localisée à l'appareil de Golgi via son domaine PH (Pleckstrin Homology) qui lie le PtdIns4P. Cette localisation est compromise dans une levure *pik1Δ*, incapable de synthétiser le PtdIns4P à partir du PtdIns (Levine and Munro, 2001, 2002). Chez *S. cerevisiae*, il a aussi été montré que le PtdIns4P joue un rôle de récepteur pour la fusion des vésicules à manteau COPII émergent du réticulum endoplasmique avec l'appareil de Golgi (Lorente-Rodriguez and Barlowe, 2011).

Une étude récente montre également un rôle du PtdIns4P en tant que régulateur-clé du trafic membranaire au niveau du réseau trans-golgien (TGN, pour Trans-Golgi Network). En effet, des levures mutantes thermosensibles *pik1<sup>ts</sup>* ont des taux de PtdIns4P fortement réduits à température restrictive et la diminution des niveaux de PtdIns4P est accompagnée de défaut d'assemblage du complexe adaptateur AP-1 (Adaptor Protein complexe 1) avec des vésicules recouvertes de clathrine (clathrin-coated vesicles). Ainsi le PtdIns4P régule un mécanisme d'assemblage d'adaptateurs essentiels à bon fonctionnement du trafic membranaire (Daboussi et al., 2012) au niveau du TGN.

Chez l'Homme, la protéine OSBP (Oxysterol binding protein), homologue humain de Osh1, également impliquée dans le transport intracellulaire des lipides, se localise au niveau du Golgi grâce à l'interaction entre son domaine PH et le PtdIns4P (Levine and Munro, 2002). Par contre, si cette interaction est essentielle à la localisation de OSBP, elle n'est pas suffisante et cet adressage spécifique au Golgi dépend également de l'interaction entre OSBP et ARF (ADP-ribosylation factor), une GTPase golgienne (Levine and Munro, 2002). De plus, OSBP est impliquée dans la voie des MAP kinases via la régulation de l'activation des protéines ERK1/2 (Wang et al., 2005). Deux autres protéines, FAPP1 et FAPP2 (Four-phosphate-adaptor protein) qui régulent le trafic membranaire golgien sont également en

complexe avec ARF et fixent le PtdIns4P via leur domaine PH pour leur localisation golgienne. Cette interaction protéine-lipide jouerait un rôle dans le transport vésiculaire allant du Golgi vers la membrane plasmique en contrôlant la production de vésicules bourgeonnant depuis l'appareil de Golgi (Godi et al., 2004). D'autres études suggèrent que l'interaction entre la protéine FAPP2 et le PtdIns4P serait également impliquée dans le transport intracellulaire des glycosphingolipides, un lipide majeur de la membrane plasmique (De Matteis et al., 2007).

### **3. Le PtdIns3P**

#### *a. Synthèse*

Le PtdIns3P représente environ 55 % des PPIIn mono-phosphorylés **de levure** et est présent en quantité équivalente aux PtdIns4P et aux PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Figure 10A). Néanmoins chez l'Homme, il représente moins de 15 % des PPIIn mono-phosphorylés et est largement minoritaire en comparaison des niveaux de PtdIns4P et PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Figure 10B). Il reste cependant le plus abondant des **PPIIn phosphorylés en position D3** (PtdIns3P, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> et PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) aussi bien dans les cellules de levures que dans des cellules quiescentes de mammifères où il représente 0,1 à 0,5% des PPIIn totaux (Falasca and Maffucci, 2006). Le PtdIns3P est produit par phosphorylation en position D3 de l'anneau inositol du PtdIns ou par déphosphorylation des PPIIn bisphosphates, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> et PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (Figure 15).

Chez *S. cerevisiae* l'unique enzyme réalisant la réaction de phosphorylation du PtdIns en PtdIns3P est la kinase Vps34 (pour **V**acuolar **P**rotein **S**orting 34) qui phosphoryle spécifiquement et uniquement le PtdIns en PtdIns3P (Herman and Emr, 1990; Schu et al., 1993). Il s'agit de la première PtdIns 3-kinase à avoir été caractérisée. Vps34 constitue l'unique sous-unité catalytique phosphorylant le PtdIns3P et est retrouvée en complexe avec la kinase Vps15. Vps15 régule l'activité de Vps34 via sa liaison directe à la protéine Gpa1-GDP (Guanosine di-phosphate). Gpa1 est une sous-unité  $\alpha$  de protéine G, qui cycle entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP, elle est localisée aux endosomes. Vps15, via ses sept répétitions WD (Trp-Asp), représenterait la sous-unité  $\beta$  de la protéine G. Ainsi, il y aurait une signalisation médiée par les protéines G au niveau des endosomes. De plus,

l'interaction du complexe Vps34-Vps15 avec Gpa1 stimule la production de PtdIns3P aux endosomes (Slessareva et al., 2006).

Le génome humain code pour huit kinases capables de produire du PtdIns3P. Elles sont regroupées en trois classes, selon leurs spécificités de substrat et leur homologie (Vanhaesebroeck et al., 2001):

- les **phosphoinositide 3-kinases de classe I (ou PI3K I)** sont capables de phosphoryler *in vitro* le PtdIns en PtdIns3P mais également le PtdIns4P en PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> et surtout le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Les PI3K I sont en réalité des hétérodimères constitués d'une sous-unité catalytique (p110 $\alpha,\beta,\delta,\gamma$ ) et d'une sous-unité régulatrice/adaptatrice (p85  $\alpha,\beta$ , p55 $\gamma$ , p101). *in vivo*, le substrat préférentiel des PI3K de classe I est le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Elles sont majoritairement cytoplasmiques. En condition basale, les PI3K I sont inactives mais elles peuvent rapidement être activées en réponse à un stimulus et synthétiser du PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> et du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (Anderson and Jackson, 2003; Lindmo and Stenmark, 2006).
- les **phosphoinositide 3-kinases de classe II** catalysent la phosphorylation en position D3 de l'anneau inositol à partir du PtdIns, du PtdIns4P et du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (avec une nette préférence pour le PtdIns). Les PI3K II ne s'associent pas à des sous-unités régulatrices mais fonctionnent sous forme de monomères. Elles possèdent un domaine C2 pouvant lier des phospholipides anioniques et adressant ces enzymes à la membrane plasmique. Le protéome humain présente trois PI3K-C2 II codées par trois gènes distincts : les PI3K-C2 II $\alpha,\beta$  (ubiquitaires) et la PI3K-C2 II $\gamma$  (essentiellement hépatique). Les PI3K II sont principalement associées aux membranes. Cependant la délétion du domaine C2 liant les phospholipides n'affecte pas leur localisation subcellulaire (Arcaro et al., 1998). Aucun homologue de PI3K de classe II n'a été mis en évidence chez *S. cerevisiae*.
- les **phosphoinositide 3-kinases de classe III** sont les homologues de la PI3K de levure Vps34. Tout comme Vps34, les PI3K III humaines ont une spécificité de substrat à l'encontre du PtdIns et sont par conséquent probablement à l'origine de l'essentiel du PtdIns3P cellulaire. La sous-unité régulatrice de hVps34 est la protéine p150, l'homologue de Vps15 de levure (Panaretou et al., 1997). L'unique

PI3K mise en évidence chez la plupart des eucaryotes, de la levure à l'Homme en passant par les amibes et les parasites, est codée par un homologue de *VPS34*. De plus la sous-unité régulatrice homologue à *VPS15* est également retrouvée dans tous ces génomes eucaryotes (Lecompte et al., 2008).

Le PtdIns3P est également synthétisé par le jeu de phosphatases telles que FIG4 (Factor Induced Gene 4, également appelée SAC3), SJL2/INP52, SJL3/INP53 et SAC1. Ces dernières possèdent toutes un domaine SAC et ce domaine leur permet de déphosphoryler de nombreux substrats de type PPI<sub>n</sub> (Hughes et al., 2000). Ainsi, elles réaliseront la conversion du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> en PtdIns3P.

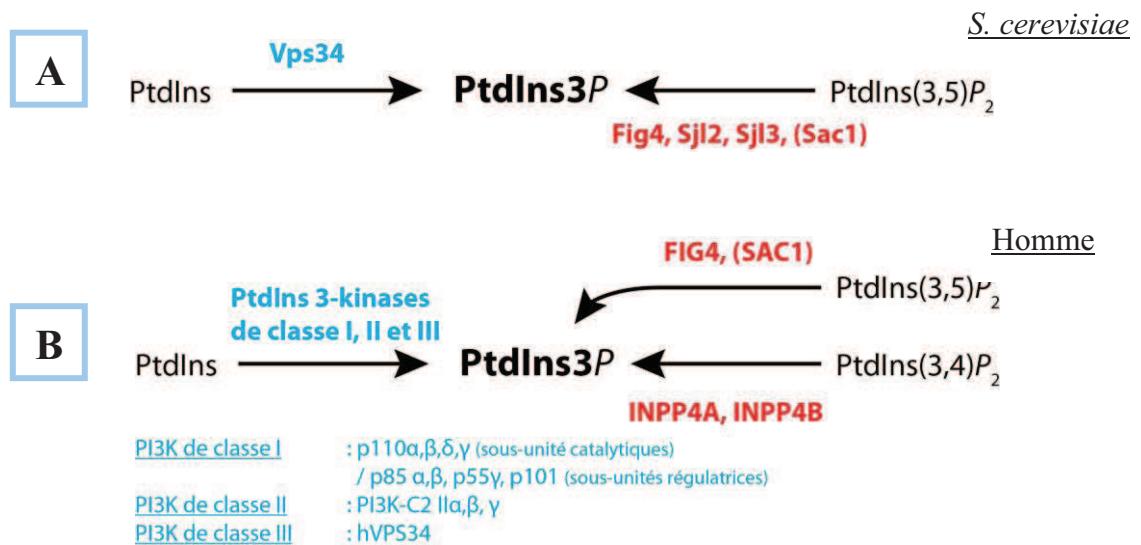
Chez *S. cerevisiae*, le nom de Fig4 (Factor Induced Gene 4) vient d'un crible de mutants présentant des défauts de conjugaison entre levures haploïdes (Erdman et al., 1998). Fig4 est une des rares PtdIns 5-phosphatases spécifiques du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (Gary et al., 2002). En microscopie à fluorescence, la protéine de fusion Fig4-GFP (Green Fluorescent Protein) est localisée à la membrane de la vacuole (Rudge et al., 2004a). Fig4 s'associe à la protéine régulatrice Vac14 et ce complexe est impliqué dans la régulation des niveaux de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, notamment en condition de stress hyperosmotique (Duex et al., 2006b). De manière très intéressante, ce complexe Fig4-Vac14 ayant une activité PPI<sub>n</sub> 5-phosphatase présente aussi un rôle régulateur de Fab1, l'unique PtdIns3P 5-kinase de levure (Gary et al., 2002).

L'homologue humain FIG4/SAC3 remplit sa fonction cellulaire de manière très similaire à Fig4. FIG4 interagit avec VAC14 et régule l'activité de PIKfyve, l'homologue humain de Fab1. Des mutations dans le gène humain *FIG4* sont à l'origine du syndrome de Charcot-Marie-Tooth type 4J, une forme récessive démyélinisante. Des fibroblastes ne produisant pas FIG4 montrent des niveaux réduits de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> suggérant que Fig4 permet la production de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> par l'activation ou la stabilisation de PIKfyve (Chow et al., 2007). Après *MTM1* et *MTMR2*, *FIG4* est donc un gène de plus impliqué dans une maladie neuromusculaire et dans la régulation du métabolisme des PPI<sub>n</sub> (Nicot and Laporte, 2008).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les phosphatases de type synaptojanin Sjl1/Inp51, Sjl2/Inp52, Sjl3/Inp53 et Inp54 hydrolysent de nombreux types de PPI<sub>n</sub>, en effet elles ont un domaine SAC en N-terminal et un domaine central 5-phosphatase. Sjl1 et dans une moindre

mesure Sjl2 agissent préférentiellement sur le PtdIns(4,5) $P_2$ , mais comme leur spécificité de substrat est faible, elles sont également capables de convertir le PtdIns(3,5) $P_2$  en PtdIns3P (Hughes et al., 2000). Ceci est particulièrement le cas de Sjl3 et de Sjl2, qui sont directement impliquées dans la régulation du niveau intracellulaire de PtdIns3P chez la levure (Parrish et al., 2004).

Les protéines humaines INPP4A et INPP4B sont des PtdIns(3,4) $P_2$  4-phosphatases (de type I et II, respectivement) déphosphorylant spécifiquement le PtdIns(3,4) $P_2$  en PtdIns3P. Elles présentent 37% d'identité au niveau de leur séquence en acides aminés et leur domaine C2 est responsable de leur liaison aux PPIn. Leur activité catalytique est médiée par un motif conservé : CX<sub>5</sub>R (Norris et al., 1997; Norris et al., 1995; Norris and Majerus, 1994). De telles PtdIns(3,4) $P_2$  4-phosphatases n'ont jamais été détectées chez la levure, qui ne synthétise pas non plus de PtdIns(3,4) $P_2$ .



**Figure 15 : Synthèse du PtdIns3P chez A) *S. cerevisiae* et B) l'humain et les enzymes en jeu. Les kinases sont représentées en bleu, les phosphatases sont représentées en rouge.**



*b. Rôle physiologique du PtdIns3P*

Dans les cellules de levure et de mammifères, le PtdIns3P est enrichi au niveau de la membrane des endosomes précoces et à la membrane des vésicules internes des endosomes tardifs (ou corps multivésiculaires, ou MVB pour « multivesicular body ») (Gillooly et al., 2000). Au niveau des endosomes précoces, il joue un rôle central dans le recrutement de protéines effectrices telles que la protéine de levure Vps27 ou son homologue humain Hrs (Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate), des protéines impliquées dans le tri endosomal des protéines. Ces deux protéines comportent un domaine FYVE (Fab1, YGL023, Vps27, and EEA1) liant le PtdIns3P endosomal et elles vont permettre le recrutement du complexe ESCRT-1 (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Henne et al., 2011; Katzmann et al., 2003; Stahelin et al., 2002). L'action concertée des 4 complexes ESCRT numérotés de 0 (formé de Vps27/HRS et Hse1/STAM) à 3 permet l'internalisation des protéines membranaires dans les vésicules internes du MVB. Cette internalisation est indispensable pour l'arrêt des cascades de signalisation médiées par ces récepteurs transmembranaires et pour l'adressage de protéines membranaires à la vacuole/lysosome (Gruenberg and Stenmark, 2004).

La protéine adaptatrice humaine EEA1 (Early Endosomal Antigen 1) se lie également au PtdIns3P avec une forte affinité via son domaine FYVE. Elle est impliquée dans la régulation des processus de fusion membranaire entre les endosomes en permettant le recrutement de la GTPase Rab5 aux endosomes (Gruenberg and Stenmark, 2004; Simonsen et al., 1998).

De même, la PtdIns3P 5-kinase Fab1 (*S. cerevisiae*) ou PIKfyve (Homme) qui catalyse la phosphorylation du PtdIns3P en PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> se fixe également au PtdIns3P via son domaine FYVE (Nicot and Laporte, 2008; Payraastre et al., 2001). Ainsi, un des rôles physiologiques du PtdIns3P est également de servir de précurseur à la synthèse du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>.

Chez *S. cerevisiae*, la délétion de *VPS34* n'est pas létale mais elle entraîne une forte diminution de la résistance à de nombreux facteurs (température, pH, éthanol, hygromycine B, stress hyperosmotique, caféine ou rapamycin). La levure *vps34Δ* présente également d'importants défauts de trafic membranaire. Parmi ces défauts, on note une morphologie et un

transport vacuolaire anormaux, une distribution incorrecte de la Carboxypeptidase Y (CPY), une absence d'autophagie et des défauts d'endocytose (Herman and Emr, 1990; Horazdovsky et al., 1995; Takegawa et al., 2003). Un des rôles essentiels de cette kinase de levure est donc d'assurer l'intégrité du tri des protéines à destination de la vacuole en produisant du PtdIns3P, lequel permettra le recrutement de protéines effectrices du trafic.

Chez *S. cerevisiae*, le PtdIns3P est également retrouvé à la surface interne des membranes d'isolation (ou phagophores), aux autophagosomes ainsi qu'à la membrane vacuolaire (Obara et al., 2008). En effet, plusieurs études ont fait le lien entre le PtdIns3P et le processus autophagique (Noda et al., 2010; Vergne and Deretic, 2010). D'ailleurs, la stimulation de Vps34, à l'origine de la synthèse de PtdIns3P, induit une activation prononcée de l'autophagie. A l'inverse, l'inhibition de l'activité PtdIns 3-kinase par la wortmannin réduit fortement l'autophagie (Petiot et al., 2000). Enfin, certaines protéines Atg (autophagy related protein), comme Atg18/Cvt18, Atg24/Cvt13 et Atg20/Cvt20 sont capables de lier le PtdIns3P (Nice et al., 2002; Reggiori et al., 2004).

Comme mentionné plus tôt, l'Homme possède un catalogue bien plus étoffé de PtdIns 3-kinases en comparaison à *S. cerevisiae*. La plupart de ces PPI<sub>n</sub> 3-kinases remplissent des fonctions différentes de celle de Vps34 de levure. En effet, chez l'Homme elles jouent également un rôle important dans des événements de signalisations cellulaires. Par exemple, les PI3K de classe I sont responsables de la production de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> à la membrane plasmique. Ce phosphoinositide triplement phosphorylé est un substrat de la phosphatase PTEN, laquelle joue un rôle de régulation de la voie de signalisation PI3K/Akt. La voie PI3K/Akt est positionnée au croisement de diverses cascades de signalisation et est notamment impliquée dans une pléthore de processus cellulaires tels que la survie cellulaire, l'apoptose, la prolifération cellulaire et le métabolisme du glucose (Liao and Hung, 2011) (Figure 16). Récemment, une étude montre un lien entre les pools de PtdIns3P, substrats de MTM1, et l'activation de la voie de signalisation de survie cellulaire médiée par Akt (Razidlo et al., 2011).

## Voie de signalisation PI3K/Akt

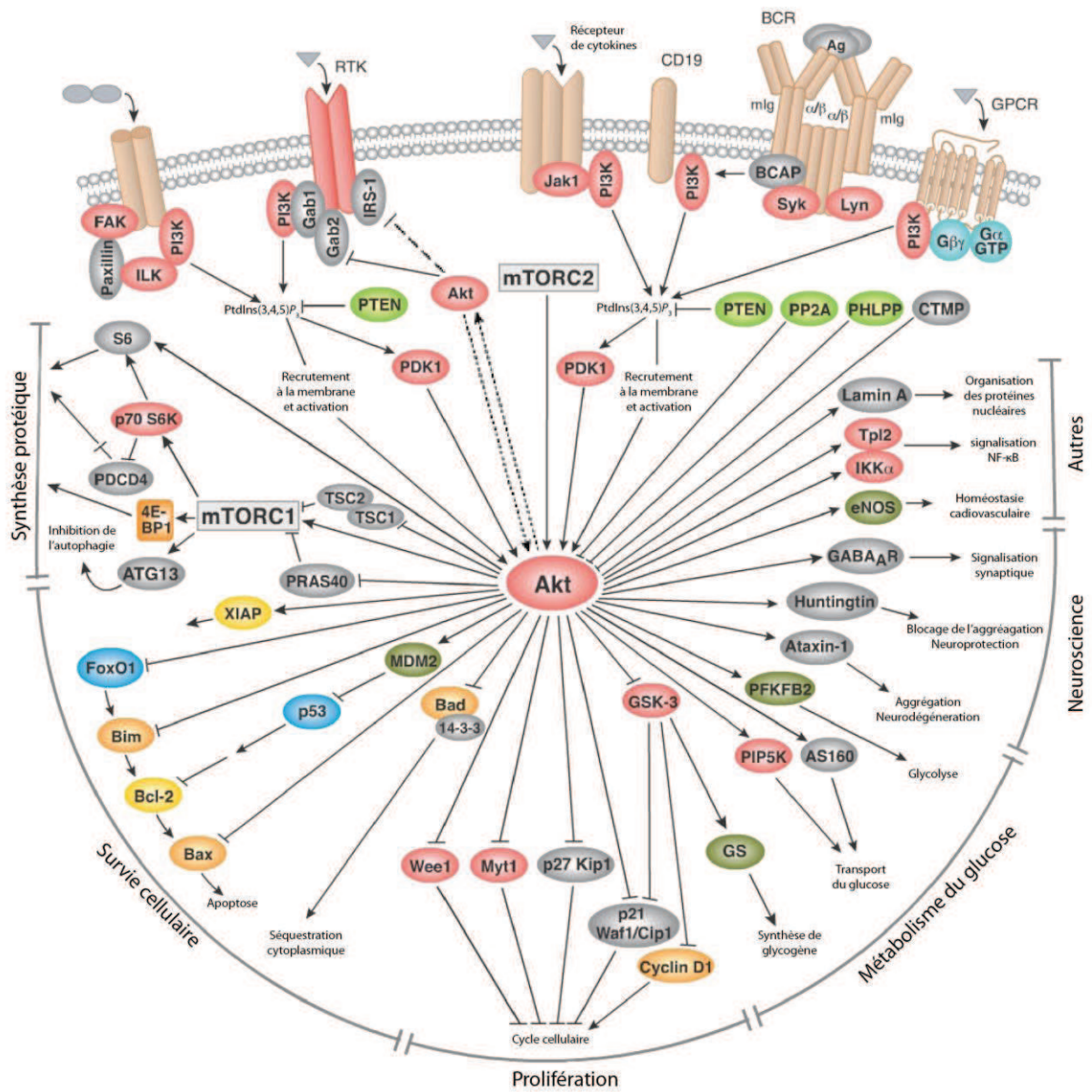


Figure 16 : Voie de signalisation PI3K/Akt et son implication dans divers processus biologique. Figure adaptée de [http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Akt\\_PKB.html](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Akt_PKB.html).

#### 4. Le PtdIns5P

##### a. Synthèse

Le PtdIns5P est le PPIn mono-phosphate identifié le plus récemment (Rameh et al., 1997). Il est longtemps resté méconnu en raison de sa faible quantité basale dans les cellules de mammifères mais également du fait des difficultés liées aux techniques permettant de le séparer du PtdIns4P. En effet, en conditions basales dans les cellules de mammifères, le PtdIns5P ne représente pas plus de 10 % des PPIn monophosphates (Figure 10).

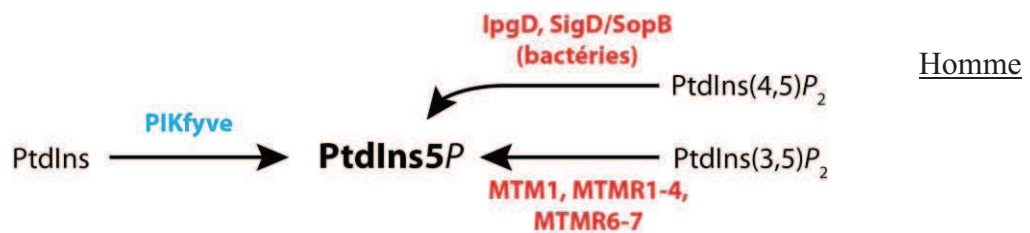
Par ailleurs, aucune étude n'a pu démontrer la présence de PtdIns5P dans une souche sauvage de *S. cerevisiae*. En effet, Ymr1, l'unique représentant des myotubularines dans la levure, est dépourvue d'activité 3-phosphatase à l'encontre du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (Parrish et al., 2004; Taylor et al., 2000). Cependant, l'expression hétérologue de la myotubularine sauvage MTMR3 dans la levure en condition de choc osmotique a permis de détecter des taux significatifs de PtdIns5P intracellulaires (Walker et al., 2001a). En effet, il a été montré qu'un stress hyper-osmotique est responsable d'une élévation des taux intracellulaires de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> et que cette augmentation de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> est dépendante de Vps34, Vac14 et Fab1 (Bonangelino et al., 2002; Dove et al., 1997). Le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> étant un substrat des myotubularines, qu'elles déphosphorylent en PtdIns5P, la présence de la 3-phosphatase humaine MTMR3 dans la levure soumise à un stress hyper-osmotique a permis de détecter le PtdIns5P dans la levure (Walker et al., 2001a).

Chez l'humain, le PtdIns5P est présent à des niveaux extrêmement faibles. Ses taux peuvent néanmoins augmenter de deux à dix fois sous l'effet d'une stimulation à la thrombine, à l'insuline ou lors de l'activation des lymphocytes T dans le type cellulaire approprié (Guittard et al., 2009; Guittard et al., 2010; Morris et al., 2000; Sarkes and Rameh, ; Sbrissa et al., 2004). Un choc osmotique peut également modifier les niveaux de PtdIns5P (Sbrissa et al., 2002; Tronchere et al., 2004). De plus, une kinase produisant directement le PtdIns5P à partir du PtdIns a été identifiée *in vitro* : il s'agit de PIKfyve (Fab1 chez *S. cerevisiae*), une PPIn 5-kinase également responsable de la phosphorylation du PtdIns3P en PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (*in vitro* et *in vivo*) (Shisheva, 2008). Ainsi différentes études montrent l'importance de l'activité de PIKfyve dans la synthèse du PtdIns5P. En effet, la surexpression

de PIKfyve induit une augmentation de PtdIns5P (Sbrissa et al., 2002) tandis que des souris hétérozygotes PIKfyve +/null présentent des niveaux réduits de PtdIns5P en comparaison aux souris contrôles (Ikononov et al., 2011). De plus, des cellules transfectées par l'oncogène NPM-ALK (tyrosine kinase nucleophosmin anaplastic lymphoma kinase) présentent une augmentation dans leur niveau intracellulaire de PtdIns5P synthétisé via la kinase PIKfyve et le PtdIns5P se localise au niveau des extensions membranaires caractéristiques de ces cellules transformées (Coronas et al., 2008).

Du côté des phosphatases, on retrouve les membres catalytiquement actifs de la famille des myotubularines possédant une activité 3-phosphatase à l'encontre du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, générant ainsi du PtdIns5P (Tronchere et al., 2004; Walker et al., 2001a). Plus récemment hJumpy/MTMR14 a été identifiée comme réalisant la même réaction (Tosch et al., 2006).

Enfin, les phosphatases bactériennes IpgD (de *Shigella flexneri*) ou SigD/SopB (de *Salmonella*) ont également été identifiées comme étant capables de générer du PtdIns5P à partir du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> à la membrane plasmique (Mason et al., 2007; Niebuhr et al., 2002).



**Figure 17 : Synthèse du PtdIns5P et les enzymes impliquées chez l'Homme.** Le PtdIns5P est indétectable chez *S. cerevisiae*. Les kinases sont représentées en bleu, les phosphatases sont représentées en rouge.

*b. Rôle physiologique du PtdIns5P*

Le rôle du PtdIns5P dans les cellules de mammifères est encore relativement mal compris. Un pool de PtdIns5P a été détecté dans le noyau et serait impliqué dans la réponse au stress, notamment en modulant l'activité du régulateur transcriptionnel ING2 (Bunce et al., 2006; Clarke et al., 2001). ING2 est en outre la première protéine identifiée comme ayant un domaine de liaison spécifique au PtdIns5P, nommé PHD (Plant HomeoDomain finger), un domaine en doigt de zinc (Gozani et al., 2003). A l'instar des domaines PH, les domaines PHD sont retrouvés dans de nombreuses protéines (la plupart nucléaires) (Aasland et al.,

1995) et peuvent lier des PPI<sub>n</sub> différents selon le domaine PHD de la protéine considérée. Malgré tout, ce pool nucléaire semble fluctuer au cours du cycle cellulaire et il semblerait que ce PPI<sub>n</sub> soit principalement localisé à la membrane plasmique et dans une moindre mesure à l'appareil de Golgi et au niveau des réticulum endo- et sarcoplasmiques (Grainger et al., 2012).

Concernant les phosphatases bactériennes IpgD et SigD/SopB, leur fonction est essentiellement de permettre à ces bactéries infectieuses d'échapper aux voies de dégradations des cellules hôtes et de promouvoir la macropinocytose dans le but de favoriser leur multiplication. En effet, la déplétion du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> de la membrane plasmique sous l'action de ces phosphatases et sa conversion en PtdIns5P se caractérise par un réarrangement drastique du cytosquelette d'actine et par une altération de la morphologie et de la fonction des cellules (Cossart, 2004; Mason et al., 2007; Niebuhr et al., 2002).

## **5. Le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>**

### *a. Synthèse*

Chez la levure, le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> est présent en quantité équivalente au PtdIns4P, soit approximativement 30 % des PPI<sub>n</sub> totaux et plus de 90% des différents PPI<sub>n</sub> bis-phosphorylés (Figure 10A et Figure 30). Chez L'Homme, il représente environ 45 % des PPI<sub>n</sub> totaux et plus de 90 % des différents PPI<sub>n</sub> bis-phosphorylés (Figure 10B). Le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> est donc un PPI<sub>n</sub> majoritaire.

Le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> est synthétisé par la PPI<sub>n</sub> 5-kinase Mss4 chez la levure (Desrivieres et al., 1998). Mss4 contient également un signal de localisation nucléaire (NLS) et fait par conséquent la navette entre le noyau et la membrane plasmique, où elle remplit sa fonction principale (Audhya and Emr, 2003). A l'heure actuelle, le rôle de Mss4 au noyau n'est pas défini. Son recrutement à la membrane plasmique où elle synthétise du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> à partir du PtdIns4P, est médié par une signalisation impliquant les caséines kinases Yck1 et Yck2 (Strahl and Thorner, 2007).

Chez l'Homme, plusieurs PPI<sub>n</sub>-kinases à l'origine du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ont été identifiées : les PIP5K de type I  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  convertissent le PtdIns4P en PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Ishihara et al., 1996;

Ishihara et al., 1998) tandis que les PIP4K de type II sont capables de convertir le PtdIns5P en PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Bultsma et al., 2010; Bunce et al., 2008).

Contrairement à la levure, les mammifères synthétisent également du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> qui peut servir de substrat à des PPI<sub>n</sub> 3-phosphatases telles que PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), TPIP $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  pour produire du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Walker et al., 2001b) (Figure 18).

*b. Rôle physiologique du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>*

Chez *S. cerevisiae* et dans les cellules humaines, le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> est majoritairement présent dans le feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique bien qu'un pool de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ait été mis en évidence au niveau de l'appareil de Golgi chez l'Homme (Watt et al., 2002).

Le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> est un régulateur majeur du cytosquelette d'actine. Chez *S. cerevisiae*, Mss4 agit en combinaison avec la PtdIns 4-kinase Stt4 (voir □III.C.2.a.) à la membrane plasmique pour générer le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Ce PPI<sub>n</sub> est essentiel pour l'activation de la cascade de signalisation des MAP kinases médiée par Rho1/Pkc1. En effet, la localisation correcte de Rom2, la GEF (GTP exchange factor) de la GTPase Rho1, dépend directement de l'interaction entre son domaine PH et le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthétisé via les kinases Stt4 et Mss4, ainsi l'activation de la voie Pkc1-MAPK dépend du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Audhya and Emr, 2002). L'organisation du cytosquelette d'actine dépend en grande partie de cette voie de signalisation (Audhya and Emr, 2002, 2003). L'activité de Mss4 et la synthèse de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> remplissent également une fonction essentielle dans l'endocytose, la sporulation et le trafic membranaire (Rudge et al., 2004b; Sun et al., 2007). La plupart de ces fonctions dépendent de protéines effectrices qui possèdent un domaine de liaison au PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, comme les domaines ENTH (Epsin N-terminal homology), ANTH (AP-180 N-terminal homology) ou PH (Pleckstrin homology) (Itoh and Takenawa, 2002).

Chez l'Homme, le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> joue un rôle majeur dans la régulation de différentes voies de signalisation, notamment en raison des variations rapides auxquelles il peut être soumis par le jeu des kinases et phosphatases à PPI<sub>n</sub> (Toker, 1998). A l'instar de la levure, le

PtdIns(4,5) $P_2$  remplit une fonction importante dans la régulation du cytosquelette d'actine. En effet, plusieurs études ont révélé des interactions entre le PtdIns(4,5) $P_2$  et des protéines régulatrices de la polymérisation de l'actine comme la profiline ou la gelsoline ou avec des protéines de liaison « cytosquelette - membrane plasmique » comme la vinculine, la taline ou la filamine (Furuhashi et al., 1992; Gilmore and Burridge, 1996; Hilpela et al., 2004; Toker, 1998; Yin and Janmey, 2003).

Chez les mammifères, le PtdIns(4,5) $P_2$  est principalement requis au niveau de la membrane plasmique pour l'endocytose médiée par la clathrine (Di Paolo and De Camilli, 2006). En effet, il sert de signal de recrutement à de nombreuses protéines effectrices de l'étape d'internalisation de l'endocytose, via un domaine protéique (ENTH, ANTH, PH) liant spécifiquement le PtdIns(4,5) $P_2$  (De Matteis and Godi, 2004 ; Di Paolo and De Camilli, 2006; Itoh and Takenawa, 2002 ). Ainsi, le domaine ENTH de l'Epsine1 lie le PtdIns(4,5) $P_2$ , et cette interaction induit un réarrangement structural de la protéine et le «démassage» d'une hélice  $\alpha$  qui va pénétrer dans la bicouche lipidique et favoriser la courbure membranaire nécessaire à la formation de la vésicule d'endocytose (Ford et al., 2001).

De plus le PtdIns(4,5) $P_2$  est également requis pour la fusion des granules de sécrétion avec la membrane plasmique dans l'exocytose (Di Paolo and De Camilli, 2006). Ainsi, une souris déficiente dans la synthèse du PtdIns(4,5) $P_2$  au niveau du cerveau, présente une accumulation de granules de sécrétion, couplée à un défaut d'endocytose, donc un défaut général du trafic vésiculaire au niveau des synapses (Di Paolo et al., 2004).

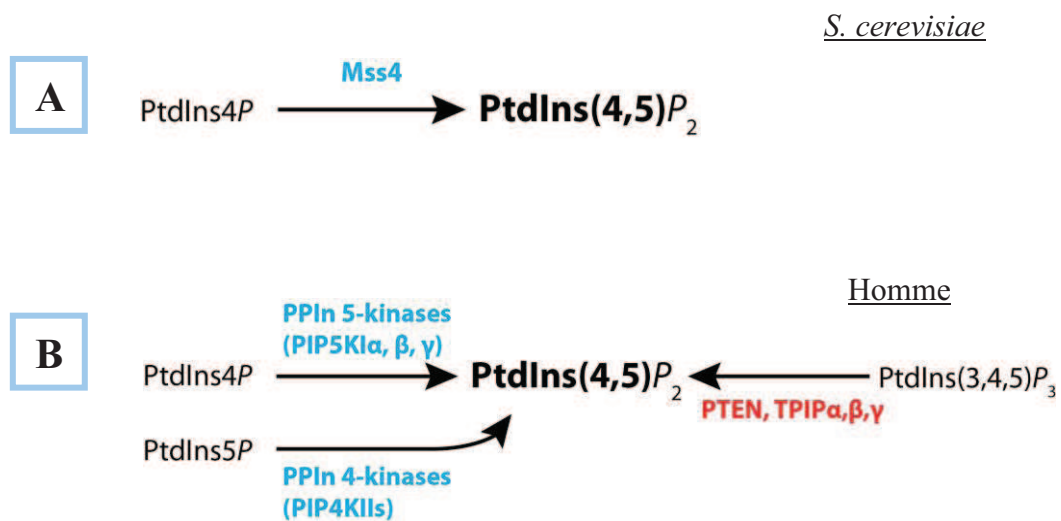
Un possible rôle du PtdIns(4,5) $P_2$  au niveau de l'appareil de Golgi a également été proposé suite à l'observation que Arf1 (ADP ribosylation factor 1) était enrichi aux membranes contenant du PtdIns(4,5) $P_2$  (Terui et al., 1994). Arf1 est un activateur de la PLD (Phospholipase D) responsable de la production d'acide phosphatidique (PA) (Brown et al., 1993). Or il a également été proposé que le PA serait un activateur des PIP5K de type I (Donaldson, 2005) et que la PLD pourrait être stimulée par le PtdIns(4,5) $P_2$  (Singer et al., 1997). Par conséquent, il est possible que la sécrétion à l'appareil de Golgi soit régulée à travers le PtdIns(4,5) $P_2$ , lequel serait impliqué dans des mécanismes de rétrocontrôles positifs et négatifs affectant l'activité de Arf1. Dans ce sens, Arf1 a été décrit comme un régulateur majeur du trafic membranaire à l'appareil de Golgi (Donaldson et al., 2005).

Enfin, le PtdIns(4,5) $P_2$  est le précurseur des inositols solubles synthétisés par l'action des phospholipases C (Plc1 chez *S. cerevisiae*, PLC $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  chez l'Homme). En effet, ces



dernières hydrolysent le  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  à la membrane plasmique pour générer du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol 1,4,5 trisphosphate ( $\text{InsP}_3$ ). Cette voie de synthèse des inositols solubles sera décrite plus en détail par la suite.

**En conclusion de cette partie, les différentes études montrent que le  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  est un régulateur majeur de la dynamique du cytosquelette d'actine dans toutes les cellules eucaryotes.**



**Figure 18 : Synthèse du  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  et enzymes impliquées chez A) *S. cerevisiae* et chez B) l'Homme. Les kinases sont représentées en bleu, les phosphatases sont représentées en rouge.**

## 6. Le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>

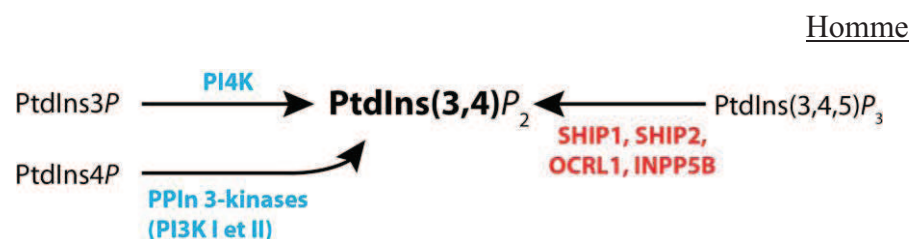
### a. Synthèse

Tout comme le PtdIns5P, aucune étude n'a pu mettre en évidence la présence de PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> chez *S. cerevisiae* (De Camilli et al., 1996; Vanhaesebroeck et al., 1997). Il est par conséquent considéré comme absent dans cet organisme.

Chez l'Homme, le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> peut être obtenu par hydrolyse du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> ou par phosphorylation du PtdIns3P et du PtdIns4P. LE PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> est essentiellement localisé à la membrane plasmique et compte pour environ 1% des PPIIn totaux en condition basale (Figure 10). Cependant ces niveaux peuvent augmenter rapidement et de façon transitoire en réponse à des stimulations par des facteurs de croissance ou des cytokines.

La phosphorylation du PtdIns4P en PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> est majoritairement réalisée par les PI3K II même s'il a été montré que les PI3K I sont également capables, *in vitro*, de réaliser cette réaction (Anderson and Jackson, 2003). La phosphorylation du PtdIns3P par des PPIIn 4-kinase n'est pas documentée pour le moment (Sasaki et al., 2009).

L'hydrolyse de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> en PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> peut être réalisée par les phosphatases PPIIn 5-phosphatases SHIP1/INPP5D, SHIP2/INPP1, OCRL1, INPP5B ainsi que par les Synaptojanines 1 et 2 (Sasaki et al., 2009) (Figure 19).



**Figure 19 : Synthèse du PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> chez l'Homme et les enzymes impliquées.** Le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> est absent chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les kinases sont représentées en bleu, les phosphatases sont représentées en rouge.

*b. Rôle physiologique du PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>*

Plusieurs études suggèrent que le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> fonctionne comme un second messenger. En effet, il est par exemple capable de recruter les protéine-kinases Akt/PKB et PDK1 via leurs domaines PH liant le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> (Hers et al., 2011). Le lien entre le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> et la voie de signalisation PI3K/Akt suggèrent que ce PPIn pourrait être impliqué dans une grande variété de processus biologiques comme le contrôle du cycle cellulaire, la survie, l'angiogenèse, la prolifération ou le métabolisme du glucose (Figure 16). Le contrôle de la balance entre le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> et le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> par le jeu des kinases et phosphatases pourrait donc jouer un rôle essentiel dans la régulation des voies de signalisation en aval de Akt/PKB (Erneux et al., 2011; Manning and Cantley, 2007). Malgré les différents travaux traitant de ce PPIn, son rôle à la membrane plasmique est faiblement documenté, en effet la plupart des études se focalisent sur le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>.

Parmi les différents domaines protéiques, seuls les domaines PH de la protéine TAPP1 (tandem PH domain containing protein 1) interagissent spécifiquement avec le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>. La protéine TAPP1 régule l'organisation du cytosquelette d'actine. Une étude suggère que la liaison de TAPP1 au PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> favoriserait le recrutement à la membrane plasmique de PTPL1 (protein tyrosine phosphatase like protein 1, ou FAP-1), une tyrosine phosphatase ubiquitaire impliquée dans la survie cellulaire (Kimber et al., 2003).

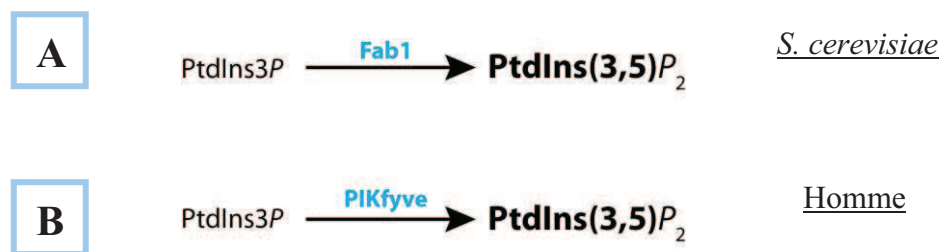
Le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> et le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> sont également impliqués dans le trafic membranaire, au niveau de la phagocytose. Ainsi le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> est localisé au niveau de la coupe phagocytaire et il est requis pour l'étape de fermeture du phagosome (Dewitt et al., 2006). Dans la phagocytose aussi, son rôle est intimement lié à celui du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>.

## 7. Le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>

### a. Synthèse

Le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> est également un PPIIn peu abondant puisqu'il représente moins de 1 % des PPIIn totaux chez l'Homme et chez *S. cerevisiae*. Il est enrichi au sein du feuillet cytoplasmique des endosomes tardifs, du MVB et de la vacuole chez *S. cerevisiae*. Chez l'Homme, sa localisation endolysosomale est très similaire à celle observée chez la levure.

La levure *S. cerevisiae* synthétise séquentiellement le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, d'abord sous l'action de la PtdIns 3-kinase Vps34 qui génère le PtdIns3P, puis par phosphorylation du PtdIns3P en PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> par la PtdIns3P 5-kinase Fab1. Chez l'Homme, la voie de synthèse du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> est similaire à celle de la levure et c'est PIKfyve, l'homologue de Fab1, qui est à l'origine du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (Shisheva, 2008). A ce jour, aucune PPIIn 4-phosphatase hydrolysant le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> n'a pu être mise en évidence. Par conséquent, il semblerait que l'unique voie de synthèse du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> passe par la phosphorylation du PtdIns3P (Figure 20).



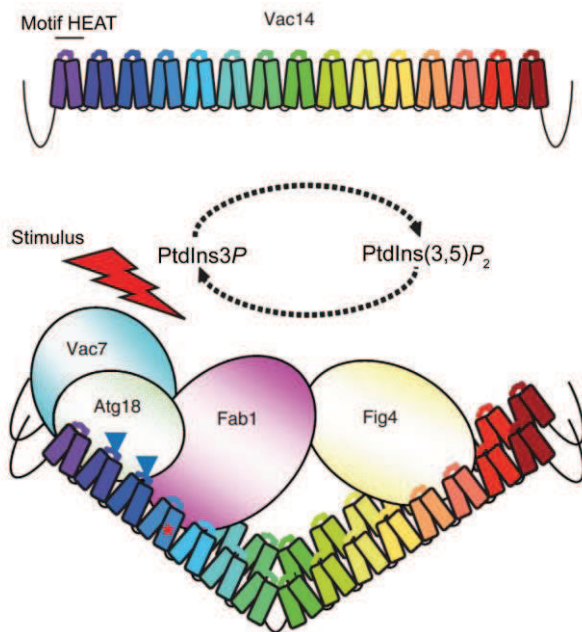
**Figure 20 : Synthèse du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> et enzymes impliquées chez A) *S. cerevisiae* et chez B) l'Homme.** Les kinases sont représentées en bleu, les phosphatases sont représentées en rouge.

Chez la levure un stress hyperosmotique active très fortement la synthèse du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> par Fab1 et augmente le taux intracellulaire de ce PPIIn de 20 fois (Dove et al., 1997). La synthèse du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> est régulée par la protéine Vac7 une protéine intégrale de la membrane vacuolaire et par Vac14 une protéine associée à la membrane de la vacuole (Bonangelino et al., 2002; Dove et al., 2002; Gary et al., 2002). Ainsi la délétion de *FAB1*, de *VAC7* ou de *VAC14* ne permet pas aux cellules de produire des niveaux détectables de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, indépendamment des conditions osmotiques (Gary et al., 1998; Bonangelino et al., 2002; Dove et al., 2002; Gary et al., 2002). Si Vac7 et Vac14 sont indispensables à la

synthèse de  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$ , elles agissent de manière indépendante. En effet Vac7 est l'activateur majeur de Fab1 lors d'un choc hyperosmotique, et Vac14 agit dans le cadre d'un complexe avec Fig4 pour réguler l'activité de Fab1 en lien avec le turn-over du  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  (Duex et al., 2006b). Ainsi de manière très surprenante, cette réponse à un stress osmotique stimulant la synthèse de  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  est également dépendante de la fonction de Fig4, la phosphatase réalisant la réaction inverse de Fab1 (hydrolyse du  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  en  $\text{PtdIns}3P$ ) (Duex et al., 2006a). Fig4, qui agit comme un activateur de Fab1 et comme une phosphatase, est également régulée par la protéine Vac14 (Duex et al., 2006b; Rudge et al., 2004a). Il existe donc une interdépendance entre kinases et phosphatases qui est essentielle à la fois pour l'équilibre dans la régulation du taux de  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  mais également pour l'activation de la production de  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  en réponse à un stimulus.

Cette régulation de la synthèse du  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  est conservée chez l'Homme, en effet PIKfyve interagit avec de multiples partenaires jouant un rôle dans l'homéostasie du  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  (Shisheva, 2008). Par exemple, PIKfyve interagit avec son enzyme antagoniste Sac3/Fig4 déphosphorylant spécifiquement le  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  en  $\text{PtdIns}3P$  (Ikonomov et al., 2009; Sbrissa et al., 2007). Cette interaction indirecte se fait par le biais de la protéine adaptatrice ArPIKfyve/Vac14 qui stabilise le complexe et stimule l'activité de PIKfyve (Ikonomov et al., 2010). De plus, dans des fibroblastes de souris mutantes *fig4* (ou *plt* pour « pale tremor mice ») ou *vac14*, le taux intracellulaire de  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  est réduit de 70% ou de 50% respectivement (Chow et al., 2007; Zhang et al., 2007).

Une étude plus récente démontre clairement l'homologie dans la voie de synthèse du  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  entre la levure et les mammifères (Jin et al., 2008). En effet, que ce soit chez la levure ou la souris, la protéine Vac14 joue un rôle de plate-forme pour la régulation de la synthèse du  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  en interagissant directement avec tous les effecteurs de cette synthèse soit : Fab1/PIKfyve, Fig4/Sac3 et Vac7. Ainsi Vac7, Fab1 et Fig4 pourront entrer en contact par l'intermédiaire de leur liaison à différentes régions de Vac14 (Jin et al., 2008) (Figure 21).



**Figure 21 : Modèle du complexe Vac14.**  
**A)** Représentation schématique de Vac14. **B)** Vac14 est capable de se lier à Fab1 et Fig4 dans des régions distinctes de Vac14 et pourrait subir un réarrangement conformationnel mettant en contact Fab1 et Fig4. Fig4 a une double fonction d'activateur de Fab1 de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> 5-phosphatase. Le site de liaison de Fab1 recouvre également les sites de liaisons de Vac7 et Atg18. Figure adaptée de (Jin et al., 2008).

b. Rôle physiologique du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>

Différentes études ont montré le rôle du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> dans la régulation du trafic entre les endosomes et la vacuole (l'équivalent du lysosome chez la levure). En effet, des études sur l'inactivation de PIKfyve ou son homologue dans *S. cerevisiae*, *C. elegans* et *Drosophila melanogaster* ont montré une vacuolisation aberrante de certains compartiments intracellulaires de la voie endo-lysosomale/endo-vacuolaire (Cooke et al., 1998; Gary et al., 1998; Nicot et al., 2006; Rusten et al., 2006; Yamamoto et al., 1995).

*FAB1* n'est pas un gène essentiel chez *S. cerevisiae* mais les cellules *fab1Δ* montrent d'importants défauts d'homéostasie vacuolaire. En effet, les levures *fab1Δ* présentent un compartiment vacuolaire anormalement élargi, occupant jusqu'à 80% du volume de la cellule. Cet encombrement lié à la taille de la vacuole peut également causer une distribution incorrecte des chromosomes lors de la division cellulaire (Yamamoto et al., 1995). De plus, les mutants *fab1Δ* présentent un défaut de croissance à 23°C, ne sont pas viables à 37°C et montrent un défaut d'acidification de la vacuole (Cooke et al., 1998; Gary et al., 1998; Yamamoto et al., 1995). La présence de Vac7 et de Vac14 qui régulent la synthèse du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> par Fab1 est requise pour permettre le maintien de la morphologie vacuolaire ainsi que pour la transmission correcte de la vacuole de la cellule mère à la cellule fille (Bonangelino et al., 1997; Bonangelino et al., 2002).

Contrairement aux mutants *vps34Δ* présentant des défauts de trafic membranaire très sévères entre l'appareil de Golgi et la vacuole, les mutants *fab1Δ* n'ont qu'un défaut partiel

suggérant que ces deux lipides, le PtdIns3*P* et le PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub>, ont des fonctions cellulaires distinctes (Bonangelino et al., 2002; Gary et al., 1998; Yamamoto et al., 1995).

Ainsi, il a été montré que le PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> joue un rôle essentiel dans le tri des protéines membranaires au niveau des endosomes tardifs/MVB (Odorizzi et al., 1998). Les protéines membranaires à destination de la vacuole sont marquées par un signal d'ubiquitination au niveau des endosomes. Ces cargos ubiquitinés seront reconnus par la machinerie des complexes ESCRT-0 à ESCRT-3 pour leur internalisation dans les vésicules internes du MVB, et après fusion entre le MVB et la vacuole, ils seront finalement délivrés dans la lumière de la vacuole (Gruenberg and Stenmark, 2004). Ce processus de tri endosomal dépendant de l'ubiquitine requiert la synthèse de PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> par Fab1 (Odorizzi et al., 1998). Ce rôle du PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> dans le tri protéique endosomal pourrait être médié par l'intermédiaire des epsines Ent3 et Ent5 dont le domaine ENTH lie le PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> et qui sont également impliquées dans l'internalisation des cargos ubiquitinés dans les vésicules internes du MVB (Eugster et al., 2004; Friant et al., 2003).

La protéine liant le plus spécifiquement et avec le plus d'affinité le PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> est à l'heure actuelle la protéine de levure Svp1/Atg18 qui joue un rôle dans l'autophagie chez la levure. De plus, la liaison entre Svp1 et le PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> est indispensable au transport rétrograde des protéines de la vacuole vers l'appareil de Golgi (Dove et al., 2004). De manière intéressante, Svp1/Atg18 joue un second rôle de régulateur de l'activité de Fab1, en se liant également à la protéine régulatrice Vac7 (elle même recrutée par la protéine plate-forme Vac14) (Figure 21). Ainsi, Svp1/Atg18 agirait comme un senseur du taux intracellulaire de PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> en permettant la régulation de sa synthèse via un rétro-contrôle impliquant Vac7 et Vac14 (Efe et al., 2007; Jin et al., 2008).

Chez la souris, les mutants PIKfyve<sup>KO/KO</sup> meurent très tôt au cours du développement embryonnaire (Ikonomov et al., 2011), ce qui témoigne de l'importance de ce lipide membranaire dans des processus cellulaires fondamentaux. Fab1 et PIKfyve possèdent toute les deux un domaine FYVE capable de lier le PtdIns3*P*. Cette interaction avec le PtdIns3*P* va permettre le recrutement de PIKfyve aux endosomes, où le PtdIns3*P* est enrichi et permettre la synthèse du PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> (Sbrissa et al., 2002). PIKfyve a été décrite comme ayant un rôle dans divers processus tels que le tri endosomal des protéines, l'homéostasie vacuolaire/lysosomale ou la régulation de voies de signalisation (Ikonomov et al., 2001).

Son rôle au niveau du tri endosomal pourrait être médié via la protéine de mammifère Vps24 (du complexe ESCRT III) qui se lie spécifiquement au  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  (Whitley et al., 2003). D'autres études montrent que chez les mammifères, le  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  régule plutôt le trafic rétrograde entre les endosomes et l'appareil de Golgi, plutôt que le trafic antérograde allant des endosomes vers le lysosome (Rutherford et al., 2006).

En conclusion, Fab1 et PIKfyve présentent une combinaison de caractéristiques et de partenaires unique. Ceci reflète le rôle particulier de Fab1 et PIKfyve dans la voie endolysosomale où elles jouent un rôle dans la dynamique de synthèse et de dégradation du  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$ . Cette dynamique doit être finement régulée pour adapter rapidement, au bon moment et en bonne place, les taux de  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  qui vont jouer un rôle dans diverses fonctions cellulaires (Ho et al., 2011; Michell et al., 2006).



## 8. Le PtdIns(3,4,5) $P_3$

### a. Synthèse

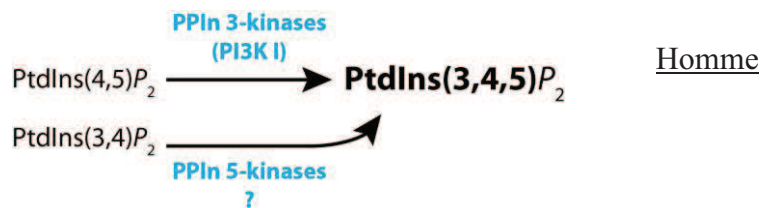
La levure *Saccharomyces cerevisiae* ne présente pas de taux détectables de PtdIns(3,4,5) $P_3$  et ce PPIIn est considéré comme absent de cet organisme (De Camilli et al., 1996; Vanhaesebroeck et al., 1997). De manière intéressante, on retrouve un homologue de la phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog) de mammifère qui déphosphoryle le PtdIns(3,4,5) $P_3$  chez *S. cerevisiae* (nommé Tep1) et chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* (Mitra et al., 2004; Wera et al., 2001). Ce qui est très étonnant car chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* la PPIIn 3-kinase de classe I (PI3K I) qui synthétise le PtdIns(3,4,5) $P_3$  est absente. Par contre, chez *S. pombe* du PtdIns(3,4,5) $P_3$  devient détectable dans les cellules *ptn1Δ*, mutantes pour l'homologue de PTEN. Cette synthèse de PtdIns(3,4,5) $P_3$  dépend de la PPIIn 3-kinase de classe III Vps34 (PI3K III), et de la PtdIns4P 5-kinase Its3 (l'homologue de Mss4), mais ne requiert pas la PtdIns3P 5-kinase Fab1 (Mitra et al., 2004). Ces études suggèrent l'existence chez les levures d'une voie de synthèse du PtdIns(3,4,5) $P_3$  à partir du PtdIns3P mais dépendant de l'unique PPIIn 3-kinase Vps34 et qui aurait évolué chez les mammifères avec l'apparition des PPIIn 3-kinases de classe I (Mitra et al., 2004).

Chez l'Homme, le PtdIns(3,4,5) $P_3$  représente moins de 1% des PPIIn totaux et il est quasiment indétectable dans des cellules quiescentes. Ses niveaux intracellulaires peuvent cependant augmenter de façon rapide et transitoire, jusqu'à 100 fois en réponse à une stimulation avec un agoniste (Milne et al., 2005). Le PtdIns(3,4,5) $P_3$  est essentiellement synthétisé à la membrane plasmique par les PPIIn 3-kinases de classe I à partir du PtdIns(4,5) $P_2$  mais il n'est pas exclu que des pools minoritaires de PtdIns(3,4,5) $P_3$  puissent exister à la membrane de compartiments intracellulaires en réponse à un agoniste. De plus il semblerait que certaines enzymes soient capables *in vitro* de produire du PtdIns(3,4,5) $P_3$  à partir du PtdIns(3,4) $P_2$  mais l'activité *in vivo* de ces PPIIn 5-kinase n'a pas pu être démontrée (Leslie and Downes, 2002; Sasaki et al., 2009) (Figure 22).

La synthèse du PtdIns(3,4,5) $P_3$  est finement régulée. En effet cette molécule signal est au centre de nombreuses voies de signalisation. Parmi les régulateurs du taux intracellulaire de PtdIns(3,4,5) $P_3$  on retrouve la phosphatase PTEN qui catalyse la déphosphorylation en

position 3 du PtdIns(3,4,5) $P_3$  pour produire du PtdIns(4,5) $P_2$  (Maehama and Dixon, 1998). PTEN a été caractérisée comme un suppresseur de tumeur et se retrouve impliquée dans de nombreux cancers (Leslie and Downes, 2002). Le rôle principal de PTEN est de réguler le cycle cellulaire et l'apoptose via son activité phosphatase requise pour la régulation de la voie de signalisation dépendant de la kinase Akt (Figure 16) (Hers et al., 2011).

Les enzymes phosphorylant le PtdIns(4,5) $P_2$  en PtdIns(3,4,5) $P_3$  correspondent aux PPI<sub>n</sub> 3-kinases de classe I (PI3K I).

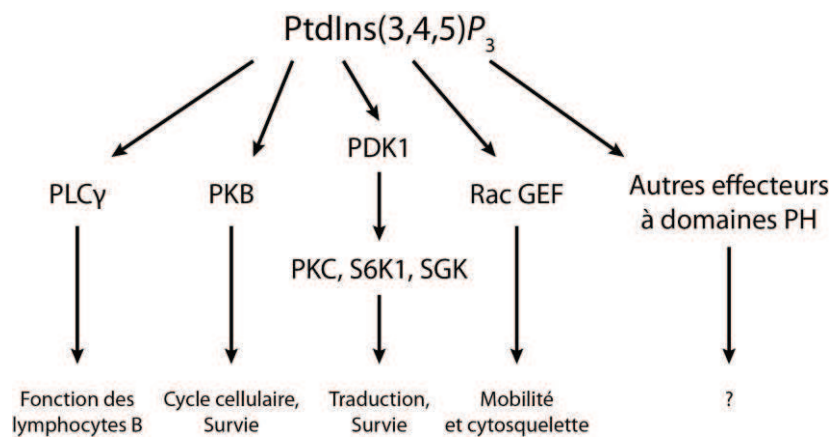


**Figure 22 : Synthèse du PtdIns(3,4,5) $P_3$  chez l'Homme et enzymes impliquées.** Les kinases sont représentées en bleu, les phosphatases sont représentées en rouge.

*b. Rôle physiologique du PtdIns(3,4,5) $P_3$*

Bien qu'il soit présent à des niveaux très faibles, le PtdIns(3,4,5) $P_3$  est sans doute le PPI<sub>n</sub> dont le rôle est le mieux caractérisé. En effet, ce PPI<sub>n</sub> est impliqué dans le développement de nombreux cancers, car il régule l'activité et la localisation intracellulaire de nombreuses protéines liant le PtdIns(3,4,5) $P_3$ . Ces effecteurs sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation (Figure 23) et sont capables de lier le PtdIns(3,4,5) $P_3$  via leurs domaines PH. En exemple, le récepteur Grp1 (General receptor for phosphoinositides 1), la cytohésine-1 et ARNO (Arf nucleotide binding site opener) peuvent lier le PtdIns(3,4,5) $P_3$ . Ces trois protéines appartiennent aux facteurs d'échange de petites protéines G de la famille Arf (ADP-ribosylation factors) (Klarlund et al., 1998). De plus, les sérine-thréonine kinases PDK1 (Phosphoinositide Dependent Kinase 1) et Akt (Figure 16) ainsi que la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) lient également le PtdIns(3,4,5) $P_3$  et font ainsi le lien entre ce PPI<sub>n</sub> et le contrôle de fonctions cellulaires comme la prolifération et la survie cellulaire, la dynamique du cytosquelette, la mobilité, le trafic membranaire et l'apoptose (Figure 23).

De manière très intéressante, certaines études ont tiré avantage de l'absence des enzymes impliquées dans la synthèse du PtdIns(3,4) $P_2$  et du PtdIns(3,4,5) $P_3$  chez *S. cerevisiae* pour analyser *in vivo* les interactions entre des domaines PH isolés et le PtdIns(3,4) $P_2$  et le PtdIns(3,4,5) $P_3$ . Pour cela, ils ont utilisé une levure mutante pour une « Ras exchange factor » et thermosensible, la souche *cdc25-ts*. Ainsi, les domaines PH capables d'adresser une protéine Ras de fusion (PH-Ras) vers la membrane plasmique lient donc le PPI<sub>n</sub> d'intérêt *in vivo* et complètent ainsi le phénotype thermosensible de la souche *cdc25-ts*. En conclusion, la co-expression d'une PI3K de classe I (absente chez la levure) et d'une protéine de fusion PH-Ras leur a permis de déterminer les domaines PH et les résidus importants dans ce domaine pour l'interaction avec le PtdIns(3,4) $P_2$  et le PtdIns(3,4,5) $P_3$  (Isakoff et al., 1998).



**Figure 23 : Voies de signalisation en aval du PtdIns(3,4,5) $P_3$ .** Adaptée de (Leslie and Downes, 2002).

Un des rôles les plus étudiés du PtdIns(3,4,5) $P_3$  est son implication dans la régulation de l'activité cellulaire de la kinase Akt (aussi nommée « protein kinase B » ou PKB) qui lie ce PPI<sub>n</sub> via son domaine PH. Akt joue un rôle très important car il va d'une part permettre l'activation de la PI3K I et la synthèse du PtdIns(3,4,5) $P_3$ , et ensuite sa liaison au PtdIns(3,4,5) $P_3$  via son domaine PH va lui permettre d'être ancré à la membrane plasmique, phosphorylé et activé par la kinase PDK1. Chez les mammifères, il existe trois isoformes de Akt nommées Akt1, Akt2 et Akt3 (ou PKB $\alpha/\beta/\gamma$  respectivement) qui sont activées par des facteurs de croissances, par différents stimuli extracellulaires, ainsi que par des mutations oncogéniques dans différents régulateurs d'Akt (Ras, les sous-unités p110 et p85 de la PI3K I et PTEN). En effet, le domaine PH d'Akt lie aussi le PtdIns(3,4) $P_2$  qui est produit par PTEN à partir du PtdIns(3,4,5) $P_3$ . La voie de signalisation PtdIns(3,4,5) $P_3$ /PtdIns(3,4) $P_2$ /Akt est

impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques dont la prolifération cellulaire, la survie et le métabolisme (Figure 16). La dérégulation d'Akt aboutit à des cancers, des diabètes et à des maladies cardiovasculaires et neurologiques. Il est donc très important de trouver des inhibiteurs agissant sur Akt pour traiter ces pathologies, ainsi parmi les inhibiteurs couramment utilisés en thérapie beaucoup agissent sur la liaison entre les PPIIn et le domaine PH d'Akt (Hers et al., 2011).

#### D. Précurseurs des inositols solubles

Les PPIIn contrôlent de nombreux paramètres. Ceci inclut la composition en PPIIn de la membrane plasmique, laquelle jouera un rôle dans les réponses au changement de l'environnement. Comme mentionné dans le chapitre □III.C.5.b. , les PPIIn mis en jeu dans ce processus sont le PtdIns, le PtdIns4*P*, PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> et le PtdIns(3,4,5)*P*<sub>3</sub>. Ces PPIIn ont été décrits dans la voie « classique » ou « canoniques » des phosphoinositides.

En condition basale, ces PPIIn sont maintenus à des taux relativement constants dans le feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique par le jeu d'une régulation fine des kinases et phosphatases décrites dans ce chapitre. Certaines études estiment que le maintien de l'équilibre de ces PPIIn au sein de la membrane plasmique représente jusqu'à 7% de la consommation basale d'ATP dans la cellule (Verhoeven et al., 1987).

Le PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> a été identifié comme prenant part à des mécanismes de transduction de signaux contrôlant une grande variété de processus cellulaires : sécrétion, métabolisme, phototransduction et prolifération cellulaire. Certaines de ces fonctions cellulaires sont dues à l'hydrolyse du PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> par les phospholipases C (PLC) ce qui va générer du diacylglycérol (DAG) et un inositol trisphosphate (Ins(1,4,5)*P*<sub>3</sub>).

##### 1. Rôle du diacylglycérol (DAG)

Le DAG va agir à la membrane en activant des protéines kinases C (PKC) impliquées dans une grande variété de processus cellulaires via des cascades de signalisation. (Berridge and Irvine, 1984; Gallegos et al., 2006).

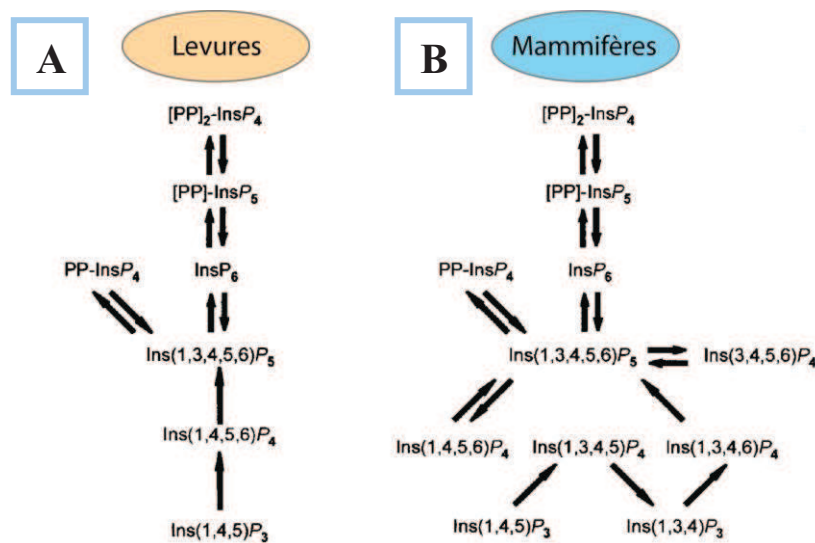
Le DAG peut par la suite être dégradé par des lipases ou être converti en acide phosphatidique (PA) par des DAG-kinases. A son tour, le PA pourra jouer un rôle de second messenger ou être relocalisé au réticulum endoplasmique pour y être reconverti en PtdIns. Le

PtdIns peut être transporté à la membrane plasmique par des protéines de transfert de type PITP (Phosphatidylinositol Transfert Protein) (Cockcroft, 1998; Cockcroft et al., 1997; Wiedemann and Cockcroft, 1998). A la membrane plasmique le PtdIns pourra séquentiellement être reconverti en PtdIns4*P* puis en PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> pour boucler le cycle.

## 2. Rôle de l'inositol (1,4,5) trisphosphate (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>)

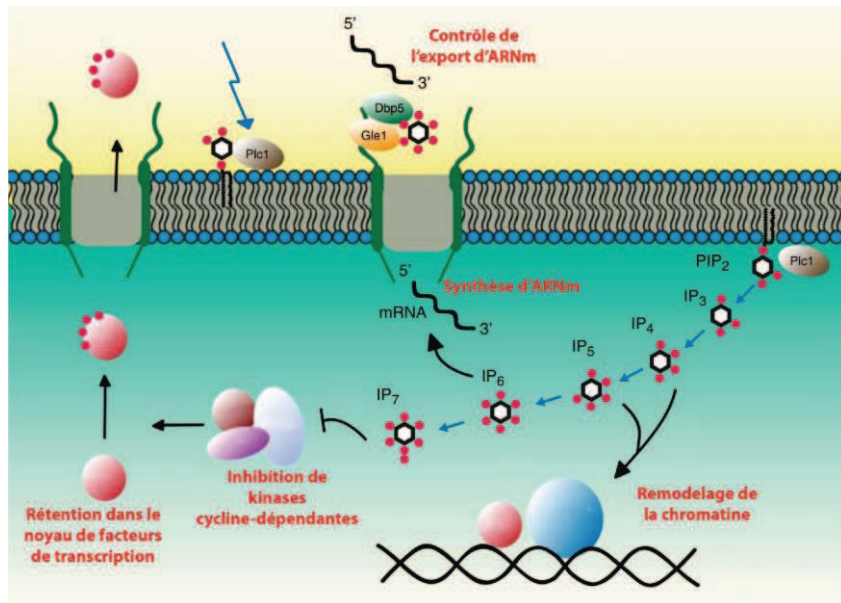
Lors de l'hydrolyse du PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub>, le DAG reste ancré dans le feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique tandis que l'Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> (ou IP<sub>3</sub>) soluble est libéré dans le cytoplasme où il jouera un rôle de second messenger pour la mobilisation du calcium intracellulaire (Berridge, 2009; Berridge and Irvine, 1984).

L'Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> va également pouvoir être sujet à une cascade de phosphorylations pour générer des inositol-polyphosphates impliqués dans de nombreux autres processus biologiques aussi bien chez la levure que dans les cellules de mammifères (Michell, 2008, 2011; Shears, 2004; York, 2006) (Figure 24 et Figure 25). Cette voie de signalisation a fait l'objet des travaux de thèse de Serge FEYDER au laboratoire. Brièvement, ses résultats de thèse montrent que chez la levure *S. cerevisiae* les inositols solubles sont impliqués dans la régulation de la voie de signalisation des Pkc1-MAP kinases dont une des fonctions est de réguler l'intégrité de la paroi cellulaire en réponse au stress chez *S. cerevisiae*. Je ne décrirai pas plus en détails ses résultats, ni cette voie de synthèse des inositol-phosphate solubles puisqu'elle n'a qu'un intérêt mineur dans cette étude.

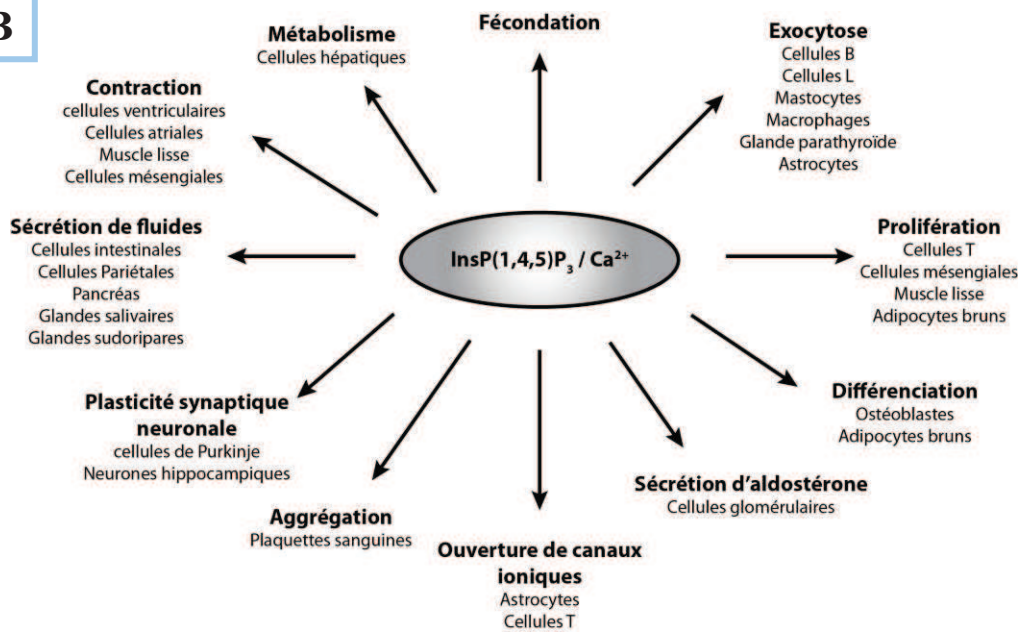


**Figure 24 : Cascades de phosphorylations à partir de l'Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> chez A) *S. cerevisiae* et chez B) l'Homme.** Les enzymes impliquées sont volontairement non indiquées puisqu'elles ne représentent qu'un intérêt limité dans cette étude. Adapté de (Shears, 2004).

A



B



**Figure 25 : Fonctions cellulaires des inositols solubles.** A) Modèle global du contrôle de l'expression des gènes par les inositols solubles dans la voie *PHO*. B) Régulation de multiples processus cellulaires par la voie de signalisation  $IP_3/Ca^{2+}$ . Adaptés de A) (Alcazar-Roman and Wente, 2008) et B) (Berridge, 2009).

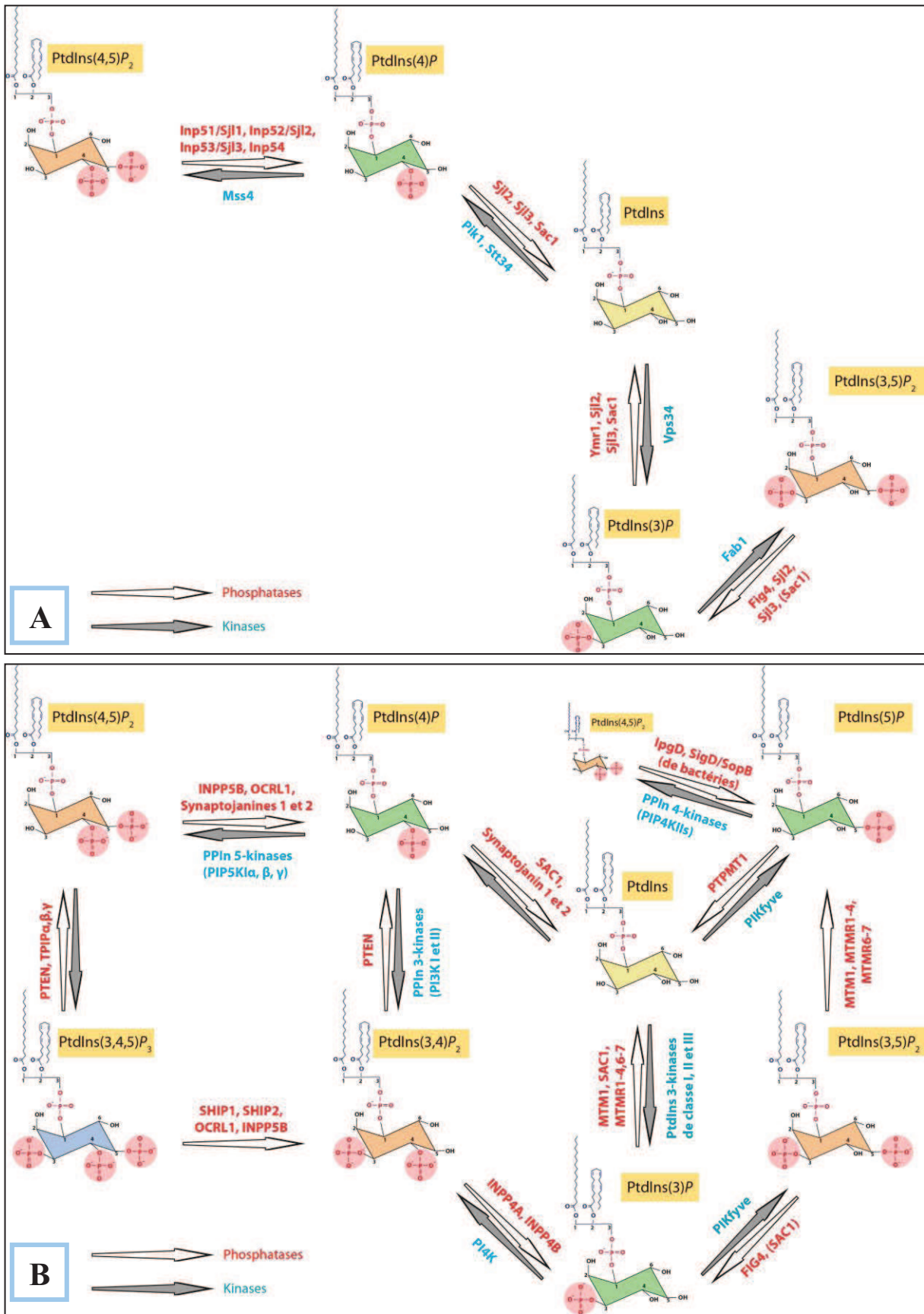


Figure 26 : Schéma global de la synthèse des différents PPI et enzymes impliquées chez A) *S. cerevisiae* et chez B) l'Homme. Les phosphatases sont représentées en rouge. Les kinases sont représentées en bleu. Les anneaux inositol mono-phosphorylés sont colorés en vert, les bis-phosphorylés en orange et les trisphosphorylés en bleu.

#### IV. Les myotubularines

Les myotubularines constituent un sous-groupe de la super-famille des tyrosines-phosphatases à double spécificité (PTP/DSP). Elles jouent un rôle dans la déphosphorylation des PPI<sub>n</sub> membranaires.

*MTM1* a été le premier gène de myotubularine identifié, sa caractérisation répondant au besoin de déterminer les mutations responsables de la XLCNM. Il a été démontré que bien qu'elle présente des similarités avec des protéines phosphatases à tyrosine (PTP), *MTM1* affiche une double spécificité (DSP) à l'encontre des lipides de type phosphoinositides : le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> dont elle déphosphoryle le groupement phosphate en position D3 de l'anneau inositol (Blondeau et al., 2000; Schaletzky et al., 2003; Tronchere et al., 2004).

Organisme	Nombre de paralogues	Nomenclature des paralogues
<i>Homo sapiens</i>	14 + 1	MTM1, MTMR1-13, hJumpy
<i>Mus musculus</i>	14 + 1	MTM1, MTMR1-13, mJumpy
<i>Canis lupus</i>	Au moins 13	MTM1, MTMR1-7, MTMR9-13
<i>Danio rerio</i>	14+1	MTM1, MTMR1-13, dJumpy
<i>Drosophila melanogaster</i>	7	Mtm, MtmR2/3, MtmR3/4, MtmR6/7/8, MtmR9, MtmR10/11/12, MtmR3/13
<i>Caenorhabditis elegans</i>	5	MTM-1, MTM-3, MTM-5, MTM-6, MTM-9
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	AtMTM1, AtMTM2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	Ymr1p

Tableau 1 : Les myotubularines sont présentes dans de nombreux organismes, de la levure jusqu'à l'Homme.

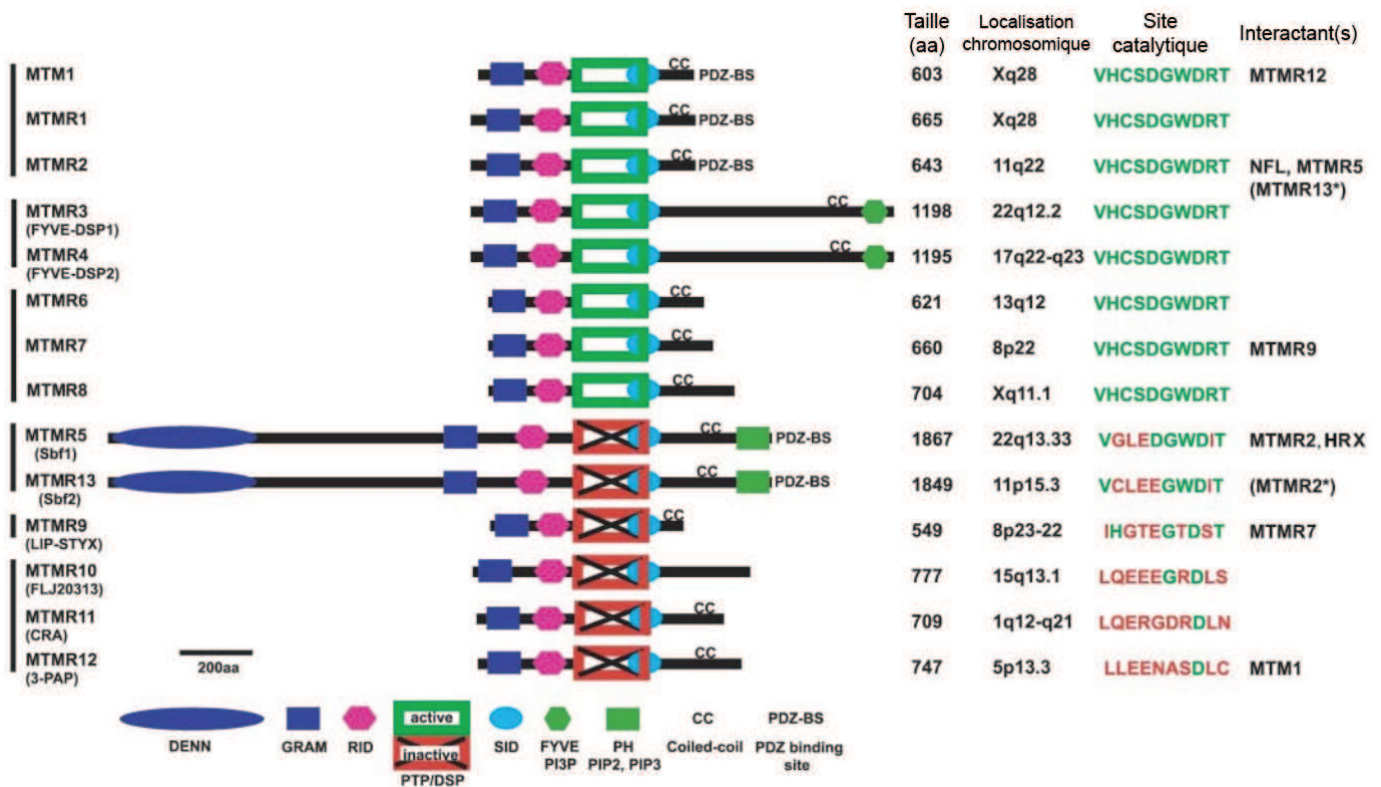
##### A. Une vaste famille

On retrouve des homologues de myotubularines chez tous les eucaryotes, de la levure jusqu'à l'homme, avec un degré relativement important de conservation (Tableau 1) (Kerk and Moorhead, 2010).



De manière intéressante, contrairement à la plupart des eucaryotes et malgré la duplication totale de son génome, *S. cerevisiae* ne dispose que d'un seul homologue de myotubularine, nommé *YMR1* (pour Yeast Myotubularin Related 1) (Laporte et al., 1998; Lecompte et al., 2008; Taylor et al., 2000).

On retrouve chez l'Homme 14 paralogues de myotubularines, plus une phosphatase apparentée nommée hJumpy. La famille est subdivisée en 6 groupes selon leurs analogies de séquence et les domaines qu'elles partagent (Figure 27). L'évolution et les relations entre les différents membres de la famille des myotubularines suggèrent des événements de duplications géniques anciens (Laporte et al., 1998; Lecompte et al., 2008; Robinson and Dixon, 2006). De plus, le fait que cette large famille ait été conservée au cours de l'évolution suggère que ses membres remplissent des fonctions cellulaires importantes.

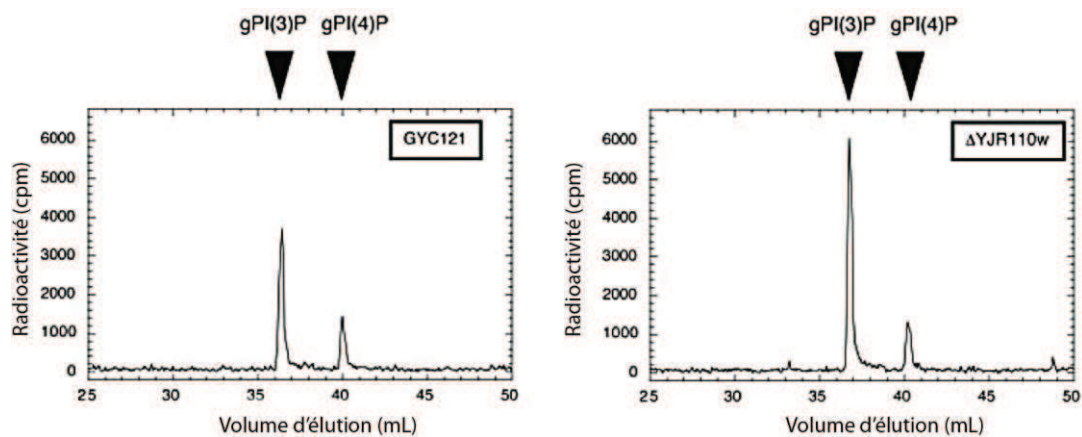


**Figure 27: Les myotubularines humaines.** Représentation à l'échelle des différents domaines des myotubularines humaines. Les barres verticales à gauche représentent les six sous-groupes. Les séquences à droite correspondent aux résidus de la poche catalytique : les acides aminés en rouge sont les résidus non conservés. Adaptée de (Laporte et al., 2003).

Les myotubularines sont PPI 3-phosphatase, déphosphorylant le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> en PtdIns et en PtdIns5P respectivement. Néanmoins, certains membres de la famille présentent des mutations conservées dans le motif CX<sub>5</sub>R caractéristique de toutes les PTP/DSP, soit au niveau de la cystéine, soit au niveau de l'arginine (Laporte et al., 2003). Ces mutations abolissent complètement l'activité phosphatase de ces myotubularines, les rendant donc enzymatiquement inactives. **Par abus de langage, je nommerai ces enzymes comme étant des « myotubularines inactives »**. J'estime en effet qu'il s'agit d'un raccourci puisque bien qu'elles soient dépourvues d'activité phosphatase, elles ne sont pas superflues, à l'image de MTMR13/Sbf2, une phosphatase enzymatiquement inactive, impliquée dans le syndrome CMT4B2 (Senderek et al., 2003).

## B. Ymr1

Chez la levure, la délétion de l'unique homologue de myotubularine, *YMR1*, n'est pas létale pour la cellule et n'entraîne pas de phénotype manifeste si ce n'est une augmentation de deux fois du taux intracellulaire de PtdIns3P (Taylor et al., 2000) (Figure 28). Cependant, des analyses plus poussées montrent que les cellules mutantes *ymr1Δ* présentent une morphologie vacuolaire plus fragmentée en comparaison à la levure sauvage (observations personnelles).

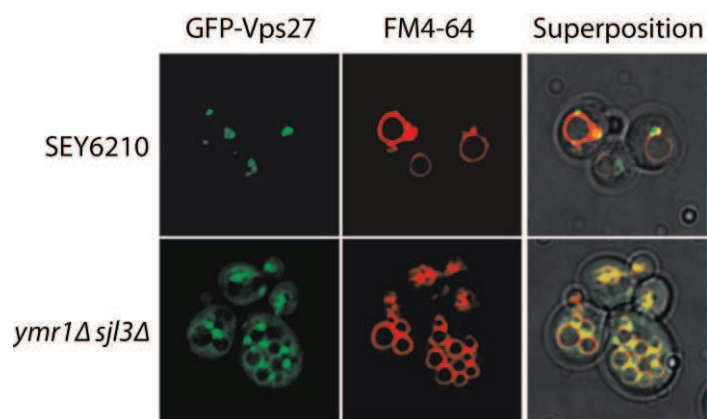


**Figure 28 : Dosages des PPI chez *Saccharomyces cerevisiae* sauvage (GYC121) ou *ymr1Δ* (ΔYJR110W).** Les graphiques représentent les profils d'élution des glycéro-phosphoinositols (gPPI) marqués radioactivement. Adaptée de (Taylor et al., 2000).

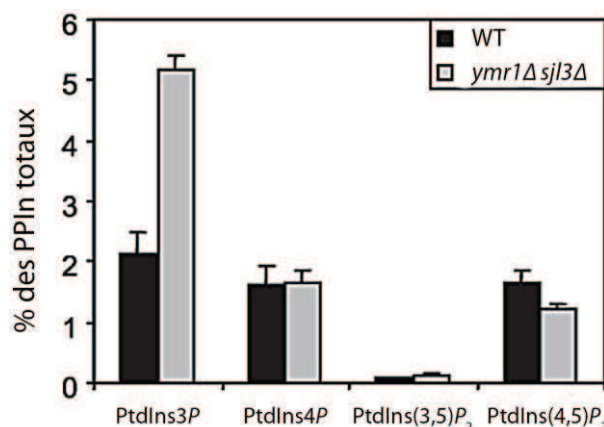
Le fait que *YMR1* ne soit pas essentiel peut s'expliquer par l'existence des protéines apparentées aux synaptojanines, les phosphatases Sjl2 et Sjl3 (Synaptojanin-like protein). En effet, ces deux phosphatases présentent une fonction redondante avec Ymr1. Elles sont néanmoins moins spécifiques que Ymr1 puisqu'elles sont capables de déphosphoryler

l'inositol aussi bien en position D3 et D4 que D5 (Figure 13), tandis que Ymr1 agit principalement sur la position D3 (Guo et al., 1999).

De plus, la redondance entre les activités de Ymr1 et de Sjl3 (et plus partiellement de Sjl2) explique la relative absence de phénotype du mutant *ymr1Δ*. Ainsi, le triple mutant *ymr1Δ sjl2Δ sjl3Δ* est létale et le double mutant *ymr1Δ sjl3Δ* présente des défauts dans le trafic vers la vacuole (Figure 29) et dans l'autophagie (Parrish et al., 2004). Ces phénotypes sont directement liés à la forte augmentation des niveaux intracellulaires de PtdIns3P (Parrish et al., 2004) (Figure 30).



**Figure 29 : Observations microscopiques de *Saccharomyces cerevisiae* sauvage (SEY6210) ou *ymr1Δ sjl3Δ*.** Adaptée de (Parrish et al., 2004). GFP-Vps27 (2 $\mu$ , URA3) est redistribuée à la membrane vacuolaire dans le mutant *ymr1Δ sjl3Δ*. De plus, le mutant *ymr1Δ sjl3Δ* présente des vacuoles fragmentées en comparaison aux cellules sauvages.



**Figure 30 : Dosage des PPIIn chez *Saccharomyces cerevisiae* sauvage (WT SEY6210) ou *ymr1Δ sjl3Δ*.** Comparaison quantitative des glycéro-phosphoinositols générés dans une levure sauvage (barres noires) ou dans le mutant *ymr1Δ sjl3Δ* (barres grises) Les cellules en phase exponentielle de croissance ont été marquées au myo-[2-<sup>3</sup>H]inositol. Adaptée de (Parrish et al., 2004).

## C. MTM1

MTM1 est constituée de 603 acides aminés et elle comprend les quatre domaines principaux : PH-GRAM (pleckstrin homology-glucosyltransferase, Rab-like GTPase activator and myotubularin), RID (Rac-induced recruitment domain), PTP/DSP et SID (SET-protein interaction domain). De plus, MTM1 possède également un motif structural carboxy-terminal de type « coiled-coil » suivi d'un site de liaison aux domaines PDZ (PSD-95, Dlg, ZO1) (Figure 27). D'après sa séquence, MTM1 est prédite comme n'ayant pas de domaine transmembranaire.

Les différentes myotubularines humaines s'articulent autour d'une structure centrale comprenant principalement quatre domaines : PH-GRAM, RID, PTP/DSP et SID (Figure 31). Des analyses d'alignements de séquences, de prédiction de domaines et d'analyses fonctionnelles, montrent que ces quatre domaines sont partagés par l'ensemble des myotubularines humaines (Laporte et al., 2003). De plus, certains de ces domaines sont également partagés avec les autres membres de la famille des myotubularines eucaryotiques. Ainsi, Ymr1 possède également les domaines PH-GRAM, RID, PTP/DSP et SID (Parrish et al., 2004). Je décrirai plus en détail ces domaines dans les paragraphes suivants.



**Figure 31 : Organisation des domaines de la myotubularine humaine MTM1 et mutations de patients.** Les mutations représentées ont toutes été identifiées chez des patients atteints de XLCNM, à l'exception de la mutation C375S, laquelle a été obtenues par mutagenèse du résidu Cystéine de la poche catalytique essentiel à l'activité phosphatase.

### 1. Structure

#### a. Le domaine PH-GRAM

Le domaine PH-GRAM est le domaine identifié le plus aminoterminal de MTM1 (acides-aminés 29 à 160 environ). Son nom lui vient de son homologie avec les domaines PH (Pleckstrin Homology) et GRAM (Glucosyltransferase, Rab-like GTPase Activator and Myotubularin) (Figure 32).

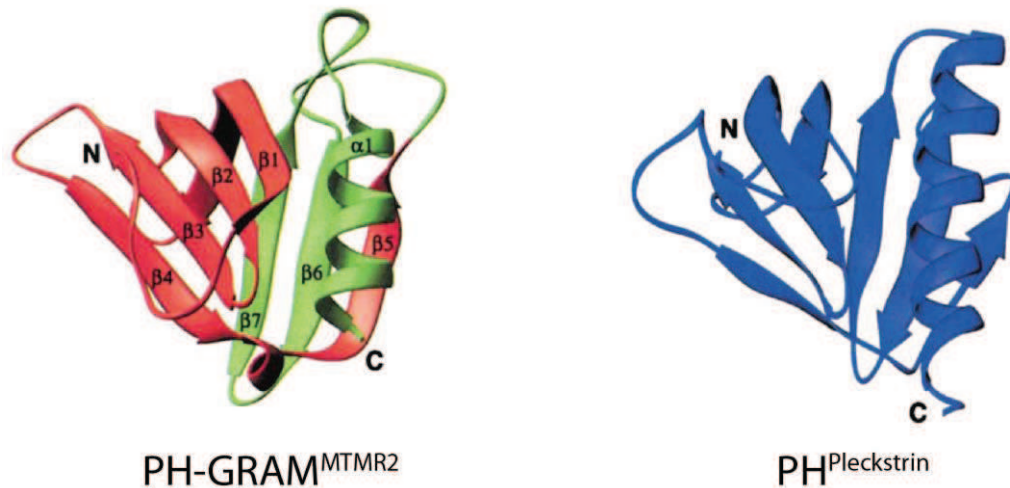


Figure 32 : Similarité structurale entre les domaines PH-GRAM et PH. Adaptée de (Begley et al., 2003).

Le domaine PH a initialement été décrit pour une protéine des plaquettes et des leucocytes, nommée pleckstrine (pour Platelet and Leucocyte C Kinase Substrate). Le domaine PH de la pleckstrine comprend environ 120 acides aminés organisés en un "sandwich" de deux feuillet  $\beta$  perpendiculaires et antiparallèles suivi d'une hélice  $\alpha$  C-terminale (Itoh and Takenawa, 2002; Yoon et al., 1994). Il est capable de fixer des lipides membranaires tels que les phosphoinositides mais est également impliqué dans le recrutement de protéines effectrices et/ou régulatrices (Cozier et al., 2004).

Plusieurs centaines de protéines contenant un domaine PH ont été identifiées chez l'Homme. Il existe toutefois une variabilité relativement importante entre les domaines PH identifiés, notamment au niveau des boucles reliant les brins des feuillet  $\beta$ . Ainsi, tous les domaines PH ne présentent pas la même spécificité ni la même affinité pour leur(s) substrat(s) (Lemmon and Ferguson, 2001). En exemple, le domaine PH de la phospholipase C  $\delta$  lie le  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  avec une forte affinité en comparaison au domaine PH de la dynamine tandis que le domaine PH de Grp1 ne lie que le  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ . On estime que 10% seulement des domaines PH fixent des PPIIn avec une forte affinité et spécificité, la dimérisation de domaines PH augmentant dans certains cas ces deux paramètres (Kavran et al., 1998; Klein et al., 1998).

Le domaine GRAM a été identifié par Doerks et al. dans un certain nombre de protéines humaines, dont les myotubularines (Doerks et al., 2000) et présente d'importantes similarités de structure avec les domaines PH, d'où sa dénomination de domaine PH-GRAM. A l'instar

des domaines PH, les domaines PH-GRAM seraient impliqués à la fois dans la liaison avec des PPIIn et dans le recrutement de protéines effectrices. En effet, les domaines PH-GRAM de MTM1 (aa 8-112) et de MTMR2 (aa 49-155) sont capables de lier de le PtdIns(3,4) $P_2$ , le PtdIns(3,5) $P_2$  et le PtdIns(3,4,5) $P_3$  mais également le PtdIns5P (Tsujita et al., 2004) tandis que le domaine PH-GRAM de MTMR6 ne fixe pas significativement les PPIIn mais jouerait un rôle essentiel dans une interaction protéine-protéine. Plus précisément, le couple **PH-GRAM** (N-terminal) de MTMR6 / **Coiled-coil** (C-terminal) est un facteur déterminant de la régulation de canaux K<sup>+</sup> activés par le Ca<sup>2+</sup> (KCa3.1). L'activité de ces canaux potassium à la membrane plasmique est inhibée spécifiquement par MTMR6 et mais par aucune autre myotubularine (Choudhury et al., 2006). Par conséquent les domaines PH-GRAM des myotubularines joueraient un rôle-clé dans l'adressage des différents membres de la famille vers des sites membranaires enrichis en PPIIn spécifiques de l'une ou l'autre myotubularine.

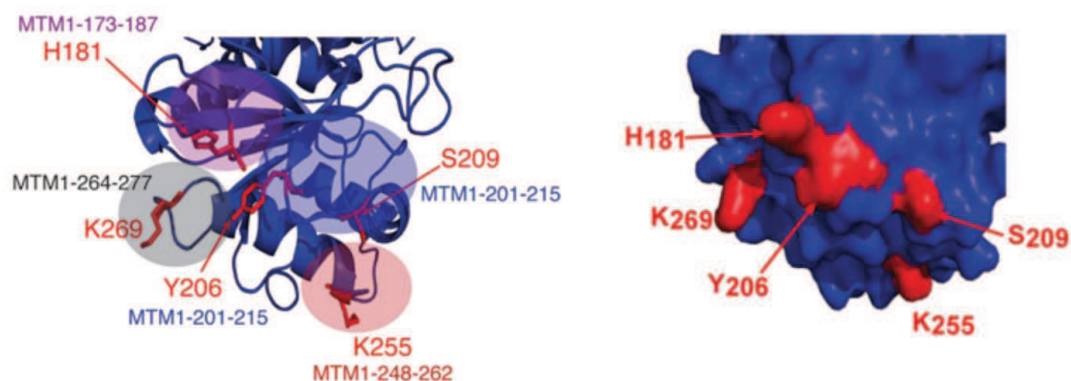
Des mutations dans le domaine PH-GRAM de MTM1 et une large délétion dans le domaine PH-GRAM de MTMR3 affectent également affecter phosphatase de ces enzymes *in vitro* (Lorenzo et al., 2005; Schaletzky et al., 2003).

b. *Le domaine RID*

Bien que MTM1 soit majoritairement cytoplasmique, la protéine a pu être détectée au niveau de renflements membranaires et de filopodes. De plus, une mutation D378A favorise cette localisation à la membrane plasmique, vraisemblablement en augmentant l'affinité de MTM1 pour ses substrats, voire en piégeant les substrats. Dès lors, il a été proposé que MTM1 pourrait avoir un rôle dans le remodelage de la membrane plasmique.

Le domaine RID (Rac1-induced localization to membrane ruffles) est très conservé au sein des différentes myotubularines humaines mais également avec la myotubularine de levure Ymr1. Ce domaine a été caractérisé suite à l'analyse de la localisation de MTM1 en présence d'un mutant constitutivement actif de la GTPase Rac1 (Laporte et al., 2002). Rac1 est une petite protéine G de la famille des Rho GTPases impliquée dans des événements de renflements membranaires et de pinocytose par le biais d'un remodelage du cytosquelette d'actine (Ellis and Mellor, 2000). L'expression du mutant dominant positif de Rac1 (Rac1-V12) induit un important remodelage membranaire et le recrutement de MTM1 au niveau de renflements membranaires. MTM1 colocalise avec Rac1 au sein de ces renflements.

D'autres résultats suggèrent que le domaine RID serait impliqué dans l'interaction avec la chaîne légère de neurofilaments (NF-L, Neurofilament-Light Chain) dans le cas de MTMR2 (Previtali et al., 2003) ou avec la desmine (une protéine de filaments intermédiaire participant à la charpente des cellules musculaires) dans le cas de MTM1 (Figure 33) (Hnia et al., 2011).

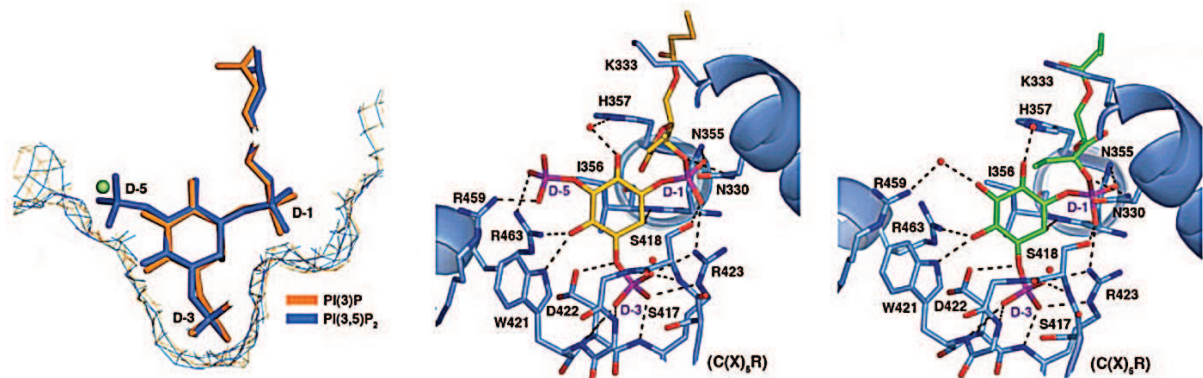


**Figure 33 : Structure prédite du domaine RID de MTM1 basée sur le modèle cristallographique de MTMR2.** A gauche, la structure en hélices, boucles et feuillets du domaine RID. Les boucles jouant un rôle dans l'interaction avec la desmine sont entourées. A droite la surface de la même zone. Les résidus indiqués en rouge correspondent aux acides aminés exposés vers l'extérieur et important pour l'interaction avec la desmine. D'après (Hnia et al., 2011).

Le domaine RID jouerait donc un rôle de relocalisation de MTM1 au niveau de renflements de la membrane plasmique lors de l'activation de la GTPase Rac1 mais également dans l'interaction avec le cytosquelette via la desmine dans les cellules musculaires ou la chaîne légère de neurofilaments dans les cellules nerveuses.

c. *PTP/DSP*

Le domaine PTP/DSP est remarquablement conservé entre les différentes myotubularines (Figure 34). Le site catalytique du domaine PTP/DSP consiste en un motif  $CX_5R$  (VHCSDGWDRT) extrêmement conservé chez toutes les myotubularines **ayant une activité phosphatase**. Le sous-groupe de myotubularines n'ayant pas d'activité enzymatique est dépourvu de ce motif (Figure 27). Il apparaît que l'activité phosphatase des myotubularines implique trois résidus essentiels du motif  $C(X)_5R$  : la cystéine et l'arginine stabilisent les substrats en formant un intermédiaire thiol-phosphate tandis que l'acide aspartique intervient dans la libération du produit.



**Figure 34 : Structure cristallographique de la poche catalytique de la myotubularine active MTMR2.**  
Adaptée de (Begley et al., 2006).

Initialement décrite comme une phosphatase à protéine (PTP) en raison du motif  $C(X)_5R$  caractéristique de cette classe d'enzyme, le domaine PTP/DSP de MTM1 est responsable de la déphosphorylation du PtdIns3P et du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> en PtdIns et en PtdIns5P respectivement. Cette particularité n'est pas une exception puisque la phosphatase humaine



PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue), qui possède également un motif CX<sub>5</sub>R, affiche aussi une préférence de substrat à l'encontre d'un phosphoinositide membranaire phosphorylé en position D3 : le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (Maehama and Dixon, 1998).

**En adéquation avec l'importante conservation du domaine PTP/DSP des myotubularines, les myotubularines ayant le motif CX<sub>5</sub>R sont enzymatiquement actives et capables de déphosphoryler leurs substrats PtdIns3P et PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> *in vitro* (Tronchere et al., 2004).**

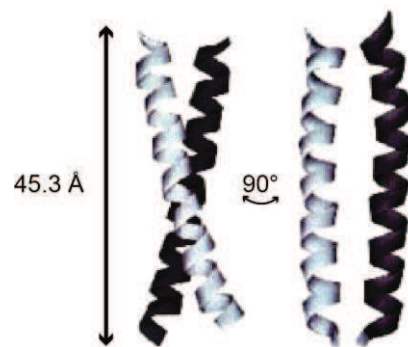
#### *d. SID*

Le domaine SID (SET-Interaction Domain) a été identifié en 1998 par Cui et col. chez la myotubularine inactive Sbf1 (SET-binding factor) (Cui et al., 1998). Cette dernière a été par la suite été renommée MTMR5. Ce domaine est unique au sein de la famille des myotubularines. Il a été montré que le domaine SID est capable d'interagir avec des protéines possédant un domaine SET (Suvar3-9, Enhancer of zeste, Tritorax) (Cui et al., 1998) retrouvé chez plusieurs protéines contribuant à des mécanismes épigénétiques de régulation de gènes (Stassen et al., 1995; Tschiersch et al., 1994) mais les informations concernant la fonction du domaine SET sont limitées (Alvarez-Venegas and Avramova, 2002).

Sbf1/MTMR5 et MTM1 produites *in vitro* interagissent avec les domaines SET de la méthyltransférase de levure Set1 et de Hrx (une histone méthyltransférase humaine) dans des expériences de co-immunoprécipitation. De plus, la surexpression de Sbf1/MTMR5 conduit à une inhibition de la fusion des myoblastes C2 en myotubes et à une transformation oncogénique dans des cellules NIH 3T3 (Cui et al., 1998). En revanche, la surexpression d'un mutant Sbf1<sup>ΔSID</sup> n'a pu mettre en évidence aucun effet inhibiteur et la délétion du domaine SID de Sbf1/MTMR5 élimine la co-précipitation avec Set1 et Hrx. **Par conséquent, l'interaction entre le domaine SID des myotubularines et les protéines à domaine SET pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans des mécanismes épigénétiques.**

e. *Coiled-coil*

Le domaine coiled-coil est partagé par l'ensemble des myotubularines (Figure 27). Il consiste en deux hélices  $\alpha$  enroulées (Figure 35). Les liaisons de Van der Waals entre deux hélices  $\alpha$  complémentaires d'un motif Coiled-coil rendent l'ensemble très stable (Mason and Arndt, 2004). **Plusieurs études ont montré l'importance du domaine coiled-coil pour l'homo- et l'hétérodimérisation des myotubularines** (Berger et al., 2003; Kim et al., 2003; Mochizuki and Majerus, 2003). Le rôle de ces dimérisations sera discuté par la suite dans le manuscrit.



**Figure 35 : Domaine Coiled-coil de MTMR2.** Les domaines Coiled-coil des myotubularines sont formés de deux hélices  $\alpha$  enroulées. Adapté de (Berger et al., 2003).

f. *PDZ Binding site*

Le nom PDZ provient des trois premières protéines dans lesquelles ces domaines ont été identifiés : PSD-95 (une protéine de 95 kDa impliquée dans la signalisation au niveau de la densité post-synaptique), DLG (la protéine « Discs Large » de *Drosophila melanogaster*) et ZO-1 (la protéine Zonula Occludens 1 ayant un rôle dans le maintien de la polarité des cellules épithéliales). Ces domaines ont également porté les noms de domaine DHR (Discs large homology repeat) ou encore « répétitions GLGF » en référence à la séquence GLGF contenue dans le domaine et très conservée. Les domaines PDZ, relativement courts (environ 90 résidus), sont le plus souvent constitués de six feuillets  $\beta$  et deux hélices  $\alpha$  repliés sous forme globulaire compacte. Ils font partie des modules protéiques les plus abondants chez les métazoaires.

Les domaines PDZ jouent principalement un rôle de module d'interaction protéine-protéine. Ils peuvent se lier à différentes séquences peptidiques, notamment à des motifs situés dans la région C-terminale cytoplasmique de récepteurs ou de canaux transmembranaires (Harris and Lim, 2001; Kornau et al., 1995; Niethammer et al., 1996).

Récemment, plusieurs études ont montré que certains domaines PDZ peuvent lier des PPIIn, notamment le PtdIns(4,5) $P_2$ , ce qui pourrait influencer la localisation des protéines avec ces domaines PDZ (Mortier et al., 2005; Yan et al., 2005; Zimmermann et al., 2002).

Etant donné que la majorité des protéines possédant des domaines PDZ sont localisées aux membranes, plusieurs études suggèrent que ces domaines permettent l'organisation de complexes de signalisation (Nourry et al., 2003; Ranganathan and Ross, 1997).

## 2. Fonction putative de MTM1

*MTM1* est exprimé de manière ubiquitaire et la protéine MTM1 déphosphoryle deux phospholipides membranaires : le PtdIns3*P* et le PtdIns(3,5) $P_2$  (Taylor et al., 2000). Le PtdIns3*P* et le PtdIns(3,5) $P_2$  sont fortement enrichis au niveau des endosomes précoces et tardifs/MVB respectivement. Le PtdIns(3,5) $P_2$  est également retrouvé à la membrane limitante des vacuoles/lysosomes. La protéine MTM1 est majoritairement cytoplasmique mais elle a également été détectée au niveau de renflements à la membrane plasmique (Kim et al., 2002; Laporte et al., 2002). La surexpression d'une protéine de fusion EGFP-MTM1 dans des cellules COS-1 induit la formation de projections membranaires et une localisation de EGFP-MTM1 à la membrane (Kim et al., 2002). De plus, bien que MTM1 soit ubiquitaire, des mutations dans le gène *MTM1* résulte en un phénotype quasi-exclusivement musculaire. Cette spécificité musculaire n'a pas encore été élucidée.

Le fait que MTM1 déphosphoryle le PtdIns3*P* et le PtdIns(3,5) $P_2$  suggère que cette PPIIn 3-phosphatase est impliquée dans la voie endolysosomale, où ces deux PPIIn sont enrichis. De plus la surexpression de EGFP-MTM1 dans des cellules COS-1 réduit fortement le marquage du PtdIns3*P* avec une sonde GST-2xFYVE alors que dans des cellules non-transfectées, la sonde GST-2xFYVE fixe le pool endosomal de PtdIns3*P* (Kim et al., 2002). **Ces résultats suggèrent que MTM1 est capable de déphosphoryler des pools endosomaux de PtdIns3*P*.**

MTM1 interagit également avec la desmine mais pas avec la chaîne légère de neurofilament (contrairement à MTMR2). Cette interaction, médiée par certains résidus du domaine RID, module l'assemblage des filaments de desmine *in vitro*. De plus l'absence de desmine ou de MTM1 résulte en des défauts similaires de positionnement et de dynamique mitochondriale dans les cellules musculaires (Hnia and Laporte, 2011; Hnia et al., 2011; Milner et al., 2000). **Une des fonctions de MTM1 serait donc liée à l'intégrité des mitochondries dans les cellules musculaires. De manière intéressante, bien que MTM1 soit ubiquitaire, sa fonction semble spécifique du muscle, un tissu très demandeur en énergie et où la fonction mitochondriale est très importante.**

En condition normale, le récepteur de l'EGF (EGFR pour Epidermal Growth Factor Receptor) est situé à la surface externe de la membrane plasmique. Lorsqu'il se lie à son substrat, l'EGF (Epidermal Growth Factor), le complexe est internalisé pour être dégradé dans le lysosome en passant par la voie endosomale. Dans des cellules COS-7 transfectées par MTM1 et non stimulées à l'EGF, l'EGFR demeure à la membrane plasmique. Suite à une stimulation à l'EGF, le complexe EGF/EGFR est correctement internalisé et colocalise au bout de 20 minutes avec des endosomes positifs pour le marqueur EEA1 mais pas avec EGFP-MTM1, qui demeure majoritairement cytoplasmique. Cependant, après 40 minutes, MTM1 est relocalisée au sein de structures contenant le complexe EGF/EGFR et colocalisant partiellement avec LAMP1, un marqueur des endosomes tardifs et du lysosome. Ce dernier temps correspond également à un pic de production du PtdIns(3,5) $P_2$  en réponse à la stimulation par l'EGF (Tsujita et al., 2004). **Ces résultats suggèrent que MTM1 est recrutée aux niveaux des endosomes tardifs en réponse à l'élévation transitoire de PtdIns(3,5) $P_2$ .**

En outre, dans les cellules COS-7 n'exprimant pas MTM1, le complexe EGF-EGFR est trié dans les vésicules internes des corps multivésiculaires (MVB/endosomes tardifs) pour être libéré dans le lumen de la vacuole. La surexpression de MTM1 dans ces mêmes cellules induit, dans environ 40% des cas, la formation de compartiments lysosomaux anormalement élargis où le complexe EGF/EGFR est retrouvé à la membrane limitante des lysosomes élargis. Des analyses par microscopie électronique montrent que ces compartiments vacuolaires anormaux comptent moins de vésicules internes en comparaison aux cellules contrôles (Tsujita et al., 2004). **La formation de vacuoles aberrantes lors de la surexpression de MTM1 pourrait être due soit à un défaut d'invagination au niveau des**

**MVB pour former les vésicules internes, soit à un défaut du recyclage à partir de la membrane vacuolaire.**

Dans les muscles, l'absence de MTM1 induit des défauts d'organisation des triades chez la souris (Al-Qusairi and Laporte, 2011; Buj-Bello et al., 2008), le poisson-zèbre (Dowling et al., 2009) et chez le labrador (Beggs et al., 2010). L'intégrité des triades, composées d'un T-tubule bordé de part et d'autre par un réticulum sarcoplasmique, jouent un rôle essentiel dans le couple excitation-contraction dans les cellules musculaires. Un défaut dans la structure et la fonction des triades expliquerait le phénotype musculaire de la XLCNM. Malgré tout, la spécificité musculaire de MTM1 reste encore à déterminer.

D'autres études chez *C. elegans* décrivent *mtm-1*, l'homologue de la myotubularine humaine, comme un potentiel régulateur négatif de la clearance des corps apoptotiques chez le ver nématode (Neukomm et al., 2011).

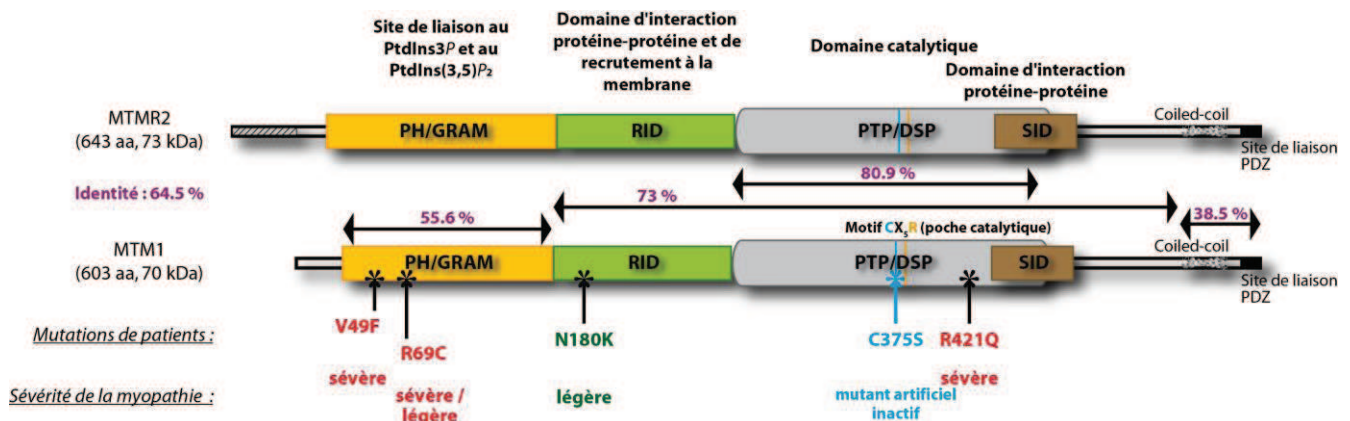
La synthèse du PtdIns3P a lieu à la membrane de diverses organelles intracellulaires. Il est donc probable que différentes myotubularines contrôlent des pools intracellulaires de PtdIns3P qui leur sont spécifiques (Clague and Lorenzo, 2005; Laporte et al., 2003; Robinson and Dixon, 2006). En effet, comme les myotubularines actives ont la même spécificité de substrat et la même activité, leur spécificité de fonction au sein des cellules réside donc très probablement dans leur adressage à la bonne place et au bon moment. Le fait qu'une myotubularine active ne soit pas capable de compenser l'absence d'un paralogue souligne bien cette spécificité de fonction indépendante de l'activité enzymatique.

**MTM1 serait donc d'une part impliquée dans la régulation du PtdIns3P au niveau des endosomes et d'autre part, dans la régulation du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> au niveau des endosomes tardifs et du lysosome. De plus, la présence de MTM1 à la membrane plasmique pourrait être impliquée dans des événements de remodelage membranaire. Concernant l'implication de MTM1 dans la XLCNM, les données les plus récentes suggèrent que MTM1 interviendrait dans la maturation tardives ou le maintien des cellules musculaires plutôt que dans leur biogenèse.**

## D. MTMR2

### 1. Structure

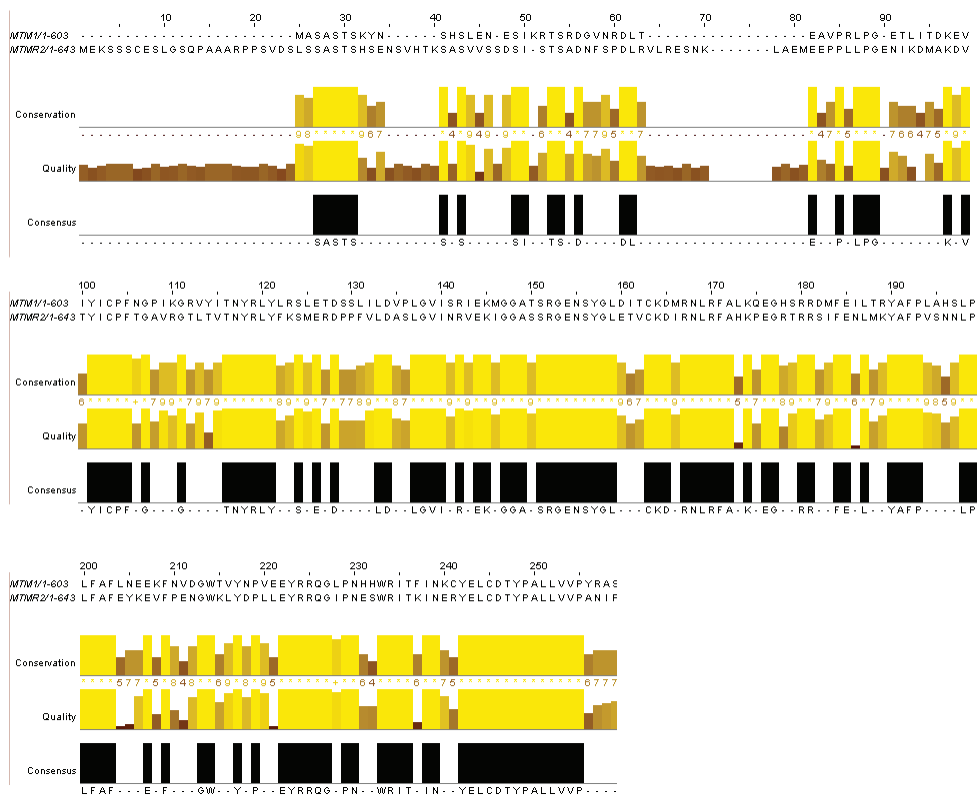
MTMR2 est très similaire à MTM1 lorsque l'on compare les séquences protéiques des deux myotubularines (Figure 36). Il s'agit sans doute de la myotubularine la mieux caractérisée puisque, contrairement à MTM1, la structure cristallographique de MTMR2 a été résolue (Begley et al., 2003) (Figure 38). La protéine est constituée de 643 acides aminés et présente les mêmes domaines que MTM1, à savoir un domaine PH-GRAM, un domaine SID, un domaine catalytique, un domaine RID, une structure en coiled-coil et un site de liaison PDZ C-terminal.



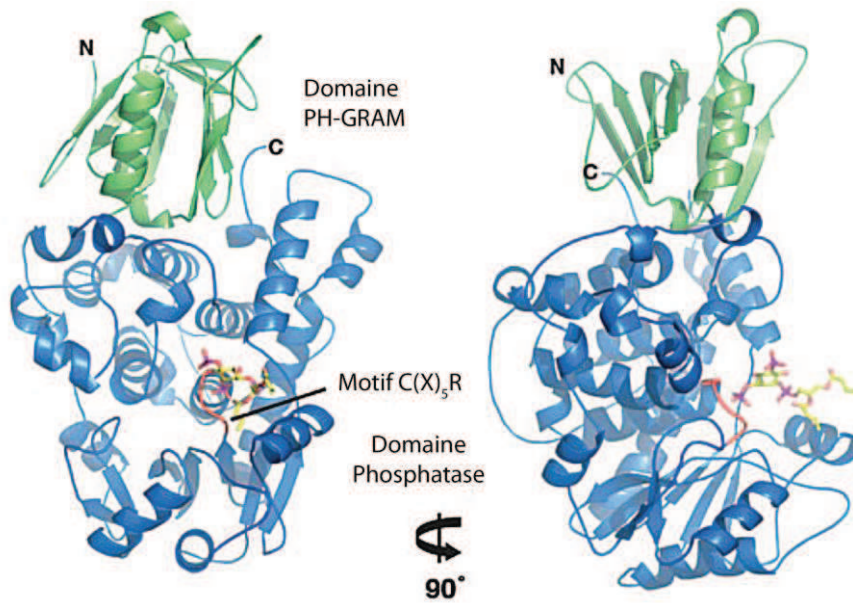
**Figure 36 : Comparaison de l'organisation des domaines entre MTM1 et MTMR2.** Les mutations indiquées pour MTM1 ont été identifiées chez des patients atteints de XLCNM, à l'exception du mutant artificiel C375S. De manière intéressante, les résidus V49, R69, N180 et R421 sont tous conservés entre les deux myotubularines. L'identité entre différentes régions de MTM1 et MTMR2 sont indiquées en violet.

La structure cristallographique de MTMR2 a révélé que le domaine catalytique des myotubularines est relativement plus grand que celui des autres PPI<sub>n</sub> 3-phosphatase, notamment en raison du domaine SID qui est remarquablement conservé au sein de la famille des myotubularines (Begley et al., 2003). L'analyse de MTMR2 montre aussi que son domaine PH-GRAM a une organisation structurellement similaire aux domaines PH conventionnels (Figure 32). En accord avec ces observations, le domaine PH-GRAM de MTMR2 est capable de lier le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, avec une préférence pour ce dernier (Tsujita et al., 2004). La cristallisation de MTMR2 en complexe avec ses substrats a également permis de comprendre avec précision les mécanismes par lesquels MTMR2 reconnaît ses substrats : le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (Begley et al., 2006) (Figure 34).

De manière intéressante, lorsque l'on compare les protéines MTM1 et MTMR2, les domaines ayant un pourcentage d'identité inférieur à la moyenne sont les domaines PH-GRAM et les extrémités C-terminales (Figure 36) et plus particulièrement à l'extrémité N-terminale du domaine PH-GRAM (mes résultats de thèse). Ces deux régions ont été décrites comme étant indispensables pour l'adressage à la membrane plasmique d'une autre myotubularine, MTMR6, pour laquelle la délétion de l'un ou l'autre domaine empêche la localisation à la membrane plasmique (Choudhury et al., 2006). **Par conséquent, il est possible que la plus faible conservation de ces deux régions (PH-GRAM et C-terminale) entre les différentes myotubularines soit, au moins en partie, responsable de la différence de spécificité de fonction des myotubularines.**



**Figure 37 : Alignement des séquences peptidiques des extrémités N-terminales de MTM1 et MRMR2. Alignement réalisé avec Jalview (<http://www.jalview.org>).**



**Figure 38 : Structure cristallographique de la myotubularine MTMR2 en complexe avec le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>.** Adaptée de (Begley et al., 2006).

## 2. Fonction putative de MTMR2

Tout comme MTM1 et les autres myotubularines enzymatiquement actives, MTMR2 déphosphoryle, *in vitro*, le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> pour générer du PtdIns et du PtdIns5P respectivement (Berger et al., 2002). Des mutations dans le gène MTMR2 sont à l'origine du syndrome de Charcot-Marie-Tooth type 4B1 (Bolino et al., 2004; Bolino et al., 2000). Les caractéristiques de cette pathologie ont été décrites précédemment (❖ □II.C).

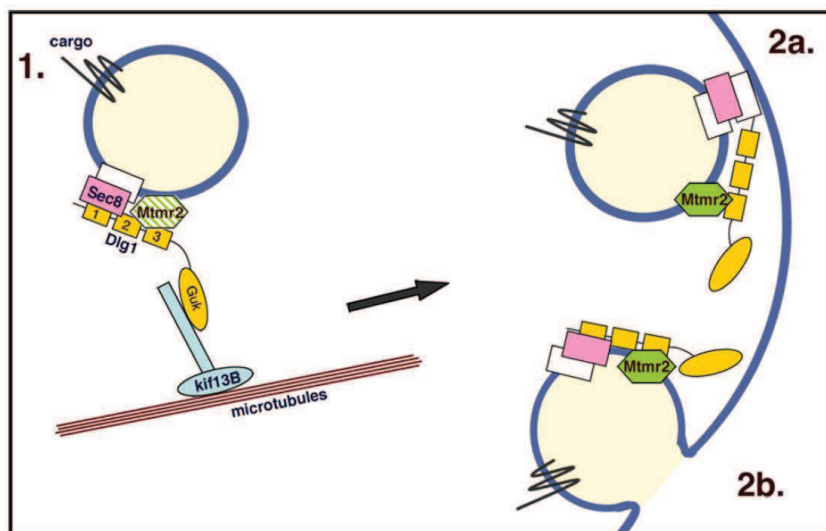
Dans des cellules COS-1, la surexpression de EGFP-MTMR2 n'induit pas de phénotype particulier en comparaison à celle de MTM1 dans les mêmes conditions (Kim et al., 2002). La distribution de la protéine de fusion EGFP-MTMR2 dans ces mêmes cellules est cytoplasmique et ne présente aucune fluorescence à la membrane plasmique contrairement à EGFP-MTM1. Une autre différence réside dans la capacité de EGFP-MTMR2 à déphosphoryler le pool endosomal de PtdIns3P. En effet, alors que EGFP-MTM1 réduit fortement la fluorescence endosomale correspondant au PtdIns3P lié à la sonde 2xFYVE, la surexpression de EGFP-MTMR2 n'induit pas de diminution de la fluorescence, suggérant qu'elle est incapable de déphosphoryler le pool endosomal de PtdIns3P dans des cellules COS-1 (Kim et al., 2002).



De plus, il a été montré que la 5-phosphatase FIG4 avait une fonction de régulation du PtdIns(3,5) $P_2$  en stimulant ou en stabilisant la PtdIns3P 5-kinase PIKfyve. En effet, l'absence de FIG4, au lieu de préserver le PtdIns(3,5) $P_2$ , provoque une diminution importante de ce PPIIn (Chow et al., 2007). Les myotubularines actives et FIG4 auraient par conséquent des fonctions antagonistes dans le contrôle du PtdIns(3,5) $P_2$ . Une étude récente a corroboré cette hypothèse en montrant une interaction génétique entre FIG4 et MTMR2 (Vaccari et al., 2011). Dans cette étude, les auteurs montrent que la perte de MTMR2 dans des neurones de souris *Fig4*-null réduit la viabilité et aggrave la neurodégénération. Ces résultats révèlent surtout la fonction de MTMR2 dans le système nerveux central. En outre, la surexpression de MTMR2 dans des levures *fig4Δ* réduit fortement les niveaux de PtdIns3P et de PtdIns(3,5) $P_2$  résultant en la formation d'une vacuole élargie similaire au mutant *fab1Δ* (Vaccari et al., 2011). **Par conséquent, ces résultats montrent, *in vivo*, le rôle de MTMR2 dans la déphosphorylation du PtdIns3P et du PtdIns(3,5) $P_2$ .**

D'autres études montrent que des souris *Mtmr2-KO* reproduisent les symptômes du syndrome humain CMT4B1. De plus, la délétion spécifique de *MTMR2* soit dans les cellules de Schwann soit dans des motoneurones, montrent que la délétion de *MTMR2* spécifiquement dans les cellules de Schwann est suffisante pour causer les symptômes de CMT4B1 chez la souris, à savoir une démyélinisation et des repliements anormaux des gaines de myéline entourant les axones. En revanche, les souris *Mtmr2-KO* délétée spécifiquement dans les motoneurones ne présentent de défauts ni dans le repliement de la myéline, ni de défaut axonal. La fonction de MTMR2 est donc spécifique des cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique (Bolis et al., 2005). De plus, dans les cellules de Schwann, MTMR2 interagit avec Dlg1, une protéine d'assemblage impliquée dans le trafic membranaire. Dans une souris *Mtmr2-KO*, la localisation de Dlg1 est altérée. Dlg1 interagit également avec la kinesine 13B (*kif13B*) et Sec8, impliquées dans le transport vésiculaire et l'ancrage membranaire dans les cellules polarisées. Les données suggèrent un mécanisme au cours duquel *kif13B* transporte Dlg1 aux sites de remodelage de la membrane afin d'augmenter la surface de membrane cellulaire, un processus ayant lieu lors de la myélinisation. Dlg1 coordonne un contrôle homéostatique de la myélinisation. En effet, l'interaction de Dlg1 avec Sec8 au niveau des vésicules de transport favorise la formation de membrane tandis que la surexpression de MTMR2 régule négativement l'addition de membrane. Ainsi les repliements anormaux de la gaine de myéline seraient dus à la perte de l'activité négative

exercée par MTMR2 et à une formation non contrôlée et anormale de membrane au cours de la myélinisation (Bolis et al., 2009). Ces résultats indiquent une fonction cellulaire de MTMR2 spécifique dans les cellules de Schwann, en régulant négativement l'apport de membrane au cours de la myélinisation.



**Figure 39 : Modèle des interactions entre MTMR2, kif13B, Dlg1 et Sec8 aux sites d'homéostasie membranaire dans les cellules de Schwann.** Selon ce modèle kif13B transporterait Dlg1, lequel organiserait une plateforme moléculaire pour coordonner les fonctions de Sec8 et MTMR2 sur la formation membranaire. Par conséquent, MTMR2 pourrait donc être **1)** soit transportée via kif13B/Dlg1 soit **2)** localisée aux sites de formation de membrane. D'après (Bolis et al., 2009).

Enfin, MTMR2 pourrait avoir un rôle dans le trafic intracellulaire en régulant les taux de PtdIns3P endosomaux. En effet, un mutant MTMR2<sup>S58A</sup> perd la capacité à être phosphorylé en position 58 et est localisé aux endosomes où il déphosphoryle le PtdIns3P. Xhabija et coll. montrent que la coexpression de MTMR2<sup>S58A</sup> avec GFP-RME-8 provoque la perte de localisation aux endosomes de RME-8 (Receptor-mediated Endocytosis 8), une protéine normalement localisée aux endosomes et identifiée chez *C. elegans* dans un crible pour des défauts d'endocytose. (Girard et al., 2005; Xhabija et al., 2012). **La régulation du pool de PtdIns3P endosomal par les myotubularines jouerait donc un rôle dans le trafic intracellulaire et dans l'endocytose.**

## E. MTMR12

MTMR12/3-PAP fait partie des myotubularines inactives, dont les mutations dans le site catalytique ne permettent pas de déphosphoryler les PPI<sub>n</sub> (Figure 27). MTMR12 est une protéine de 747 acides aminés et possède les quatre domaines partagés avec l'ensemble des myotubularines : PH-GRAM, RID, un domaine catalytique inactif et un domaine SID. Elle présente par ailleurs un motif coiled-coil.

MTMR12 a été décrite comme interagissant avec MTM1 et cette interaction stimule l'activité phosphatase de MTM1 (Caldwell et al., 1991; Nandurkar et al., 2001; Nandurkar et al., 2003). La distribution de MTMR12 en fusion avec l'EGFP se présente globalement sous la forme d'un réseau cytoplasmique avec un enrichissement au niveau de structures périnucléaires (Figure 40).

## F. Les différentes MTMRs (Myotubularin-related proteins)

### 1. MTMR1

MTMR1 est une myotubularine très semblable dans son organisation à MTM1. Elle est composée de 665 acides aminés et comporte tous les domaines identifiés chez MTM1. MTMR1 n'a pas fait l'objet d'analyses poussées et peu d'informations sont disponibles à son sujet. Le gène *MTMR1* est situé sur le chromosome X, adjacent au gène *MTM1*. La protéine codée par ce gène est une phosphatase active, affichant la même activité et spécificité de substrat que MTM1 (Tronchere et al., 2004). Un patient atteint de myopathie myotubulaire a été décrit comme ayant une large délétion couvrant une zone allant de *MTM1* à *MTMR1*. Toutefois, la condition de ce patient était plus liée à un défaut lié à l'absence de MTM1 qu'à l'absence de fonction de MTMR1 (Zanoteli et al., 2005).

### 2. MTMR3 et MTMR4

Les myotubularines MTMR3/FYVE-DSP1 et MTMR4/FYVE-DSP2 appartiennent au même sous-groupe des myotubularines enzymatiquement actives. En plus des domaines communs à toutes les myotubularines, ces deux PPI<sub>n</sub> 3-phosphatases possèdent un domaine coiled-coil et un domaine FYVE liant potentiellement le PtdIns3P. Elles sont également

sensiblement plus grandes que la plupart des autres membres de la famille, à l'exception de MTMR5 et MTMR13, avec 1198 acides aminés pour MTMR3 et 1195 acides aminés pour MTMR4.

MTMR3 déphosphoryle le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> *in vitro* et *in vivo* dans *S. cerevisiae* (Walker et al., 2001a). L'expression hétérologue de MTMR3 dans la levure induit par ailleurs un élargissement vacuolaire similaire aux mutants *fab1Δ* incapables de synthétiser le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (Walker et al., 2001a). De plus, MTMR3 a été décrite comme étant capable de déphosphoryler des protéines au niveau des résidus Thr/Ser et Tyr *in vitro* mais avec une efficacité environ 3 fois moindre en comparaison aux PTPs classiques (Zhao et al., 2000). EGFP-MTMR3 est distribuée dans le cytoplasme et dans une zone périnucléaire (Lorenzo et al., 2006; Zhao et al., 2000).

De manière surprenante, le domaine FYVE de MTMR3 est atypique dans la mesure où il ne lie aucun PPIIn et qu'il n'est pas indispensable à l'activité enzymatique de la protéine (Lorenzo et al., 2005). En revanche, le domaine PH-GRAM de MTMR3 est indispensable à sa liaison avec les substrats et lie préférentiellement le PtdIns5P, un potentiel activateur allostérique des myotubularines (Schaletzky et al., 2003). La production de PtdIns5P à la membrane plasmique par l'expression ectopique de la phosphatase bactérienne IpgD induit la translocation de MTMR3 à la membrane plasmique. Cette relocalisation est dépendante du domaine PH-GRAM. Étonnamment, un mutant MTMR3<sup>ΔPH-GRAM</sup> en combinaison avec une mutation dans le site actif est accumulé à l'appareil de Golgi. **Les caractéristiques de MTMR3 suggèrent donc que sa fonction est liée au PtdIns3P et à la production de PtdIns5P par les myotubularines. Sa fonction de PTP reste encore à préciser.**

MTMR4 est très similaire à MTMR3 dans son organisation. Elle possède également un domaine FYVE. EGFP-MTMR4 colocalise aux endosomes avec EEA1 et Hrs, deux protéines à domaine FYVE liant spécifiquement le PtdIns3P (Lorenzo et al., 2006). Des travaux plus récents montrent que MTMR4 est localisée à l'interface entre les endosomes précoces et les endosomes de recyclage et régule le tri de cargos tels que la transferine (Tfn) dans les endosomes de recyclage. De plus, la surexpression de MTMR3 ou MTMR4 dans des cellules COS-1 (Naughtin et al.) ou dans des cellules HeLa (Lorenzo et al., 2005) réduit fortement le nombre d'endosomes positifs pour la sonde 2xFYVE liant le PtdIns3P suggérant que MTMR4 déphosphoryle ce PPIIn *in vitro* (Naughtin et al., 2010; Zhao et al., 2001). **MTMR4**

**serait pas conséquent impliquée dans la régulation du trafic endosomal en régulant les niveaux intracellulaires de PtdIns3P.**

### **3. MTMR6, MTMR7 et MTMR8**

Ces trois MTMRs constituent un sous-groupe des myotubularines au regard de leur similarité. MTMR6, MTMR7 et MTMR8 sont constituées de 621, 660 et 704 acides aminés respectivement. Elles possèdent les domaines retrouvés chez les myotubularines mais par contre elles sont dépourvues de site de liaison PDZ.

A l'instar de MTM1, MTMR6 déphosphoryle le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (Schaletzky et al., 2003). Une mutation C366S dans la poche catalytique abolit complètement son activité enzymatique. La particularité de MTMR6 réside dans sa capacité à réguler négativement des canaux potassium activés par le calcium (K.Ca3.1) (Srivastava et al., 2006; Srivastava et al., 2005). En effet, les domaines coiled-coil de MTMR6 interagissent avec des canaux K.Ca3.1 et ainsi MTMR6 inhibe le flux de potassium régulé par ces canaux. Cette inhibition est dépendante de l'activité phosphatase de MTMR6 **et uniquement celle de MTMR6**. En effet, aucune autre myotubularine ne compense l'absence de MTMR6 (Choudhury et al., 2006).

Concernant MTMR7 et MTMR8, mis à part qu'elles sont globalement similaires en organisation à MTMR6, peu de données sont disponibles dans la littérature. *MTMR7* a été décrit comme étant essentiellement exprimé dans le cerveau. Elle est également la seule myotubularine à pouvoir déphosphoryler l'inositol phosphate soluble Ins(1,3)P<sub>2</sub> en addition du PtdIns3P avec une préférence pour l'Ins(1,3)P<sub>2</sub> (Mochizuki and Majerus, 2003). MTMR7 est associée aux membranes des endosomes tardifs dans des neuroblastomes de souris N1E-115 (Mochizuki and Majerus, 2003). **MTMR7 aurait donc une fonction spécifique dans les cellules du système nerveux central où elle interviendrait au niveau des endosomes tardifs.**

**En ce qui concerne MTMR8, sa fonction a principalement été étudiée chez le poisson-zèbre où elle joue un rôle dans le modelage des filaments d'actine, dans le développement du muscle et de l'architecture vasculaire (Mei et al., 2009; Mei et al.,**

2010). Les distributions de MTMR6, MTMR7 et MTMR8 en fusion avec l'EGFP dans les cellules HeLa sont représentées Figure 40.

#### **4. Sbf1/MTMR5 et Sbf2/MTMR13**

MTMR5 est une myotubularine inactive de 1876 acides aminés, ce qui fait d'elle la plus grande protéine de la famille avec MTMR13, une autre myotubularine inactive de 1849 résidus. Ces deux myotubularines se distinguent des autres membres non seulement par leurs tailles mais également par la présence d'un domaine DENN (Differentially Expressed in Neoplastic versus Normal cells) à l'extrémité N-terminal (Figure 27). Ce domaine est un module protéique commun, ancien et conservé. Jusqu'à très récemment, peu de choses étaient connues quant à sa fonction. De nouvelles études ont révélé que les domaines DENN peuvent interagir directement avec des petites GTPases de la famille Rab et que les domaines DENN fonctionnent enzymatiquement en tant que facteurs d'échange GDP/GTP (GEF) spécifiques des Rab. **Ces résultats suggèrent que les protéines possédant un domaine DENN pourraient être des régulateurs de la fonction des Rab-GTPases et offrent des perspectives quant à l'implication des protéines à domaines DENN dans les voies de trafic membranaire** (Firestein and Cleary, 2001; Marat et al., 2011).

La surexpression de Sbf1/MTMR5 conduit à une inhibition de la fusion des myoblastes C2 en myotubes et à une transformation oncogénique dans des cellules NIH 3T3 (Cui et al., 1998). Il a par ailleurs été proposé que le domaine SET de MTMR5, impliqué dans des interactions protéine-protéine, joue un rôle critique dans la croissance et la différenciation cellulaire. De manière intéressante, Sbf1/MTMR5 est une myotubularine catalytiquement **inactive** et la surexpression d'un mutant **actif** Sbf1<sup>HCS</sup> bloque la différenciation des myoblastes. Ces données ont conduit à l'hypothèse de l'existence d'« anti-phosphatases », dont le mode d'action consiste en une compétition avec les phosphatases actives (Cui et al., 1998; Hunter, 1998). Ce modèle sera discuté dans la suite du manuscrit.

De plus, des souris MTMR5-KO présentent des défauts dans la spermatogenèse mais ne présentent aucun signe de neuropathie (Firestein et al., 2002).

MTMR5 et MTMR13, en plus d'un domaine PH-GRAM, sont pourvues d'un domaine PH additionnel à l'extrémité C-terminale. De manière très intéressante, le domaine PH-GRAM de Sbf2/MTMR13 a été décrit comme liant préférentiellement le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>

(Berger et al., 2006). Cette particularité pourrait influencer la localisation de ces deux myotubularines, notamment lorsque les taux de  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  augmentent en réponse à une stimulation.

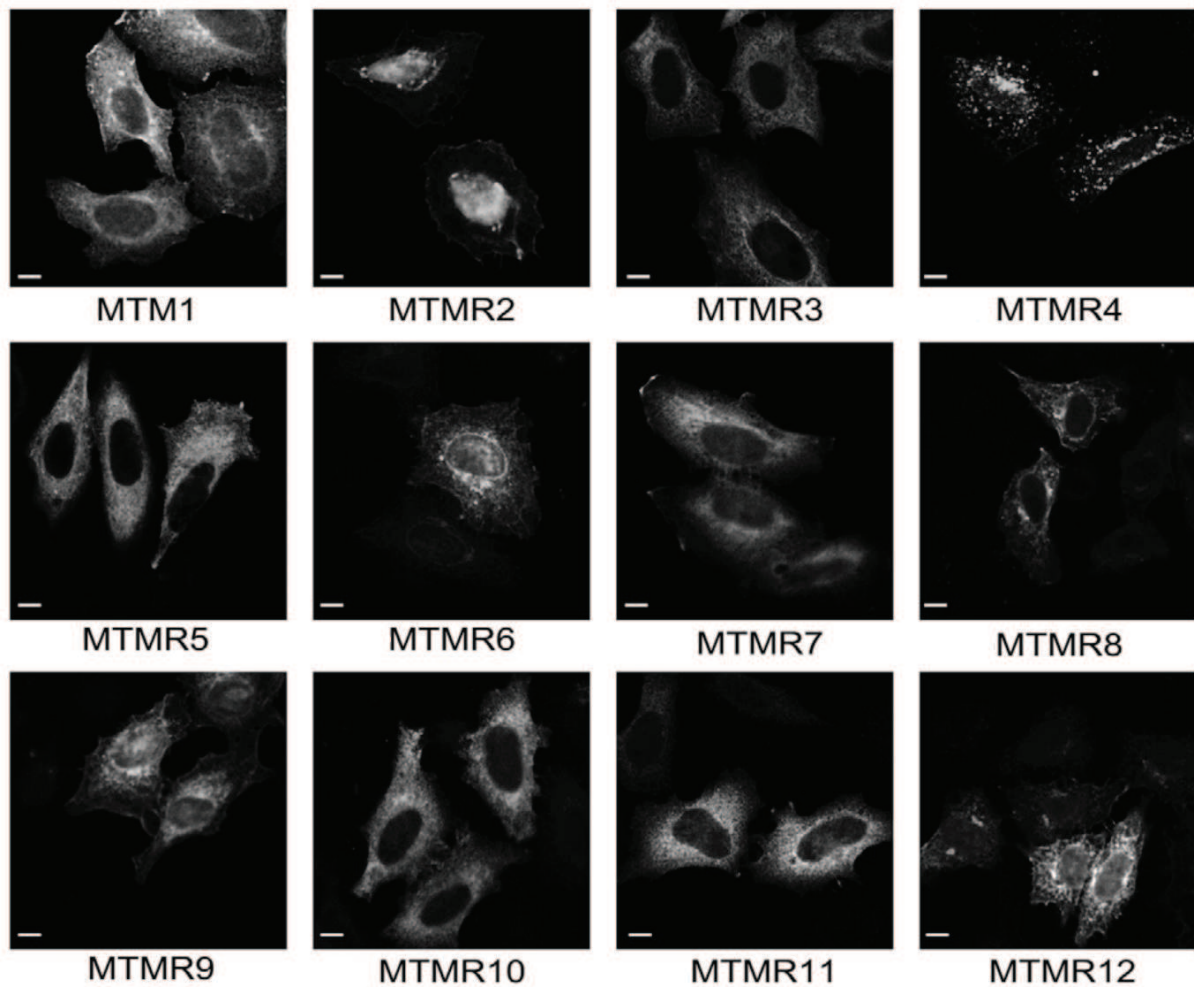
MTMR13, également inactive, a été identifiée comme étant responsable d'une forme du syndrome de Charcot Marie Tooth, la CMT4B2 très proche de celle provoquée par des mutations dans MTMR2 (Azzedine et al., 2003; Robinson and Dixon, 2005; Senderek et al., 2003). Il a été proposé que les myotubularines inactives pouvaient se fixer aux mêmes substrats que les myotubularines actives et de cette manière protéger les PPIn de la déphosphorylation. Cependant le fait que deux formes de syndrome CMT sont causées par une perte de fonction de myotubularines soit actives soit inactives rend l'hypothèse des « anti-phosphatases » peu probable (Hunter, 1998).

## **5. MTMR9**

MTMR9 est la plus petite des myotubularines avec une séquence peptidique de 549 acides aminés. Elle a été initialement identifiée par spectrométrie de masse comme étant un partenaire de MTMR7 (Mochizuki and Majerus, 2003). **Des résultats récents suggèrent que des variations génétiques dans le gène *MTMR9*, plus particulièrement des mutations faux-sens, pourraient être un facteur de prédisposition à l'obésité et à l'hypertension via la régulation de neuropeptides hypothalamiques.** En effet, le transcrit ainsi que la protéine MTMR9 ont été détectés dans l'aire latérale hypothalamique et dans le noyau arqué de souris. L'expression de *MTMR9* est augmentée lors d'un jeûne et diminue lorsque l'animal est nourri d'aliments gras (Yanagiya et al., 2007).

## **6. MTMR10, MTMR11**

Très peu de données sont disponibles concernant la fonction putative de ces deux myotubularines inactives. MTMR10 présente la particularité de ne pas avoir le motif coiled-coil, que toutes les autres myotubularines possèdent. De son côté, MTMR11 est le seul membre des myotubularines pour lequel aucune interaction avec une autre myotubularine n'a été identifiée.



**Figure 40 : Distribution cellulaires des myotubularines dans des cellules HeLa fixées.** 48h après transfection, la distribution des différentes myotubularines fusionnées à l'EGFP a été visualisée. Adapté de (Lorenzo et al., 2006).

### G. Relations et interactions entre les myotubularines

Dans un premier temps, il a été proposé que les myotubularines actives et inactives pouvaient entrer en compétition pour les substrats et que la fonction des myotubularines « inactives » étaient de protéger les substrats d'une déphosphorylation par les membres actifs. En réalité les différents membres de la famille des myotubularines peuvent s'associer pour former des homo- ou des hétéro-dimères de myotubularines (Laporte et al., 2003). Ces interactions se font entre deux membres enzymatiquement actifs soit entre une myotubularine



active et une myotubularine enzymatiquement inactive (Lorenzo et al., 2006). Chez *S. cerevisiae*, aucune analyse n'a été rapportée concernant une possible homodimérisation de Ymr1, bien que cela soit peut probable si l'on tient compte de l'importance du motif coiled-coil dans la dimérisation (Mason and Arndt, 2004), un motif a priori absent dans Ymr1.

Les premières analyses sur la fonction de ces dimérisations montrent que les interactions hétérodimériques stimulent l'activité PPIn 3-phosphatase du partenaire actif. Des relocalisations subcellulaires de certains complexes hétérodimériques ont également été rapportées (Berger et al., 2006; Kim et al., 2003; Laporte et al., 2003; Mochizuki and Majerus, 2003; Nandurkar et al., 2003; Robinson and Dixon, 2005; Zou et al., 2009).

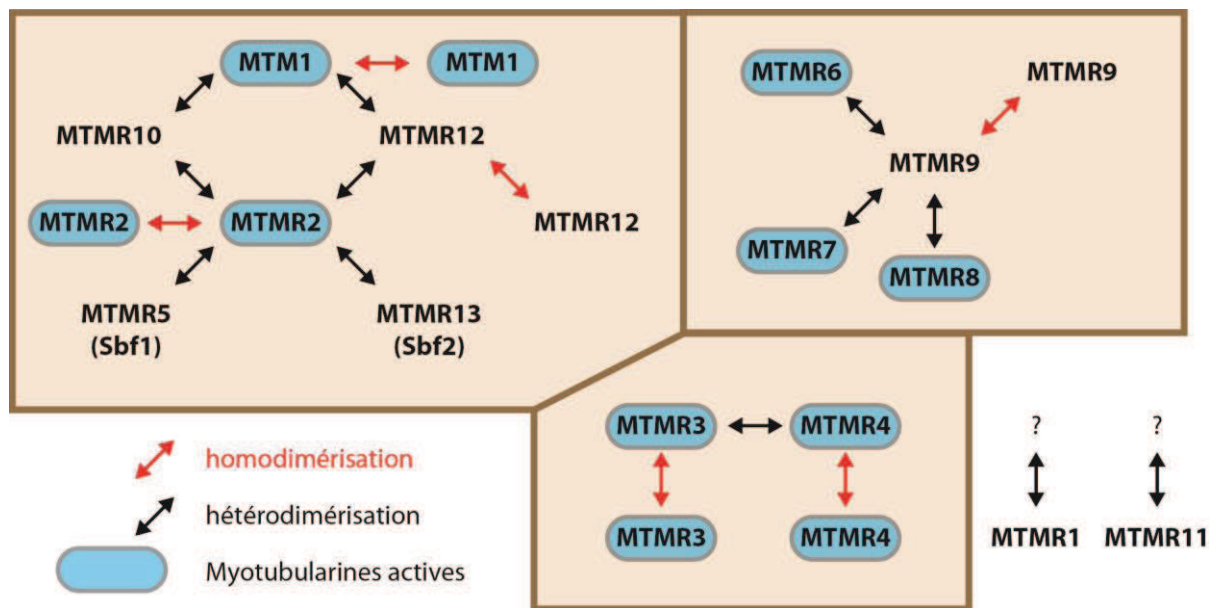
De plus un effet catalyseur de l'interaction hétérodimérique a été rapportée en 1991 par Caldwell et col. lorsque ces auteurs ont isolé des complexes de 3-phosphatases à partir de cerveaux de rats. Dans leur étude, les auteurs montrent que l'homodimère de 3-phosphatase (2 sous-unités de 65kDa) a une activité enzymatique environ 3 fois inférieure à l'hétérodimère (1 sous-unité de 65 kDa associée à une sous-unité de 78kDa) (Caldwell et al., 1991). Avec le recul et les connaissances actuelles, il est légitime de supposer que la sous-unité de catalytique de 65 kDa correspond aujourd'hui à la myotubularine MTM1 de rat et que la sous-unité régulatrice de 78kDa porte désormais le nom de MTMR12 chez le rat (Nandurkar et al., 2001).

Les interactions entre les différents membres des myotubularines sont schématisées Figure 41. Parmi ces interactions, il a été montré que MTM1 interagit avec 3-PAP/MTMR12 et que cette interaction requiert le domaine SID de MTMR12. Surexprimée seule dans des cellules COS-7, MTM1 est localisée dans le cytoplasme et au niveau de la membrane plasmique où elle va induire, lorsqu'elle est fortement produite, des projections de filopodes. Lorsque *MTM1* est coexprimé en combinaison avec *MTMR12*, la localisation à la membrane plasmique de MTM1 et le phénotype de remodelage membranaire sont perdus. Le complexe MTM1/MTMR12 est essentiellement localisé dans le cytoplasme mais un enrichissement au niveau de certaines structures ponctuées MTM1-positives ont été rapportées en addition à la distribution cytoplasmique (Nandurkar et al., 2003).

Un autre exemple est celui de MTMR2 qui est principalement régulé par MTMR5 et MTMR13. Les deux domaines coiled-coil de MTMR2 et de MTMR5 sont essentiels pour leur interaction (Kim et al., 2003). *in vitro*, l'activité 3-phosphatase de MTMR2 peut être stimulée

lorsqu'elle est en complexe avec MTMR13 (Berger et al., 2006). De plus, chez la souris la disruption du gène *MTMR13* chez la souris induit des défauts de repliement des gaines de myéline dans les cellules nerveuses périphériques, une caractéristique retrouvée chez l'Homme dans le syndrome CMT4B2 (Robinson et al., 2008; Tersar et al., 2007).

Les données actuelles suggèrent que l'interaction de MTMR2 avec MTMR5 jouerait un rôle dans la spermatogenèse tandis que la formation du complexe MTMR2-MTMR13 pourrait être un moyen de réguler l'homéostasie de la myéline dans les cellules de Schwann. L'association de MTM1 avec MTMR12 serait un moyen de réguler de manière spatiotemporelle la localisation de MTM1. MTMR12 serait donc une protéine adaptatrice de MTM1.



**Figure 41 : Réseau d'interactions entre les membres de la famille des myotubularines.** On distingue trois grands groupes de partenaires : le groupe « MTM1-MTMR2 », le groupe « MTMR6-8 » et le groupe « MTMR3-4 ». Bien que l'essentiel des dimérisation se fasse entre un partenaire actif et un partenaire inactif, certaines myotubularines sont capables de s'homodimériser (MTM1, MTMR2, MTMR3 et MTMR4) et de s'hétérodimériser entre membres actifs (MTMR3 et MTMR4). D'après (Lorenzo et al., 2006; Robinson and Dixon, 2005).

## V. Objectifs de cette étude

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet plus vaste visant à décrypter les mécanismes responsables du développement de deux pathologies neuromusculaires distinctes : la **myopathie centronucléaire liée au chromosome X (XLCNM)** et la **neuropathie de Charcot-Marie-Tooth 4B1 (CMT4B1)**.

Le constat initial fait état de mutations dans deux gènes différents comme étant à l'origine de ces deux pathologies différentes. Pourtant ces deux gènes distincts codent pour des protéines appartenant à la **même famille des myotubularines** : MTM1 et MTMR2. Chez l'Homme, ces deux myotubularines sont très similaires dans leur organisation et leurs activités *in vitro* sont indifférenciables. En effet, MTM1 et MTMR2 sont des PPIIn 3-phosphatases réalisant d'une part l'hydrolyse du PtdIns3P en PtdIns et générant d'autre part du PtdIns5P par déphosphorylation du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>.

La première question que l'on peut se poser est donc la suivante : « **Quels sont les dysfonctionnements responsables du développement de la XLCNM ?** ». Pour répondre à cette question, j'ai basé mes travaux sur l'analyse des myotubularines humaines MTM1 dans le modèle *S. cerevisiae*. Le modèle de la levure est un modèle de choix dans l'analyse du métabolisme des phosphoinositides, pour les nombreuses raisons citées dans mon introduction. Ainsi, j'ai exprimé de manière hétérologue, chez *S. cerevisiae*, la phosphatase humaine MTM1 sauvage ou présentant des mutations faux-sens identifiées chez des patients atteints de formes plus ou moins sévères de XLCNM. Ces mutations touchent plusieurs domaines de la protéine (Tableau 2).

J'ai par conséquent réalisé une analyse comparative de ces différentes versions de MTM1 mutantes dans le but de comprendre la fonction intracellulaire de MTM1 et les possibles dysfonctionnements liés à la présence des différentes mutations. Il va de soi que l'analyse d'une protéine impliquée dans une maladie musculaire dans un modèle d'eucaryote unicellulaire et (est-il nécessaire de le préciser) dépourvu de muscle peut paraître audacieux. Mais c'est précisément l'étude de MTM1 dans ce contexte « naïf » qui fait la force du modèle *S. cerevisiae*. D'un côté, la présence de 14 paralogues de myotubularines dans les cellules humaines rend particulièrement difficile l'analyse de la fonction spécifique d'une seule myotubularine. D'un autre côté, la présence d'un seul homologue de myotubularine dans *Saccharomyces cerevisiae*, Ymr1, ajouté au fait que le métabolisme des PPIIn est très similaire

à celui des eucaryotes supérieurs, ainsi que la facilité liée aux techniques de culture sont autant d'avantages en faveur de la levure.

Parmi les mutations faux-sens de MTM1, nous nous sommes intéressés à cinq mutations, touchant différents domaines de la protéine : MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup>, MTM1<sup>N180K</sup>, MTM1<sup>S376N</sup>, et MTM1<sup>R421Q</sup> (Tableau 2 et Figure 31).

Mutation	Modification au niveau de la protéine	Sévérité de la XLCNM	Référence
145G→T	V49F	Sévère	(Herman et al., 2002)
259C→T	R69C	Légère à sévère	(de Gouyon et al., 1997)
540T→G	N180K	Très légère	(Biancalana et al., 2003)
1181G→A	S376N	Sévère	(Laporte et al., 1997)
1316G→A	R421Q	Sévère	(de Gouyon et al., 1997)

**Tableau 2 : Mutants faux-sens de MTM1 analysés dans cette étude.**

L'analyse de ces mutants pourrait aider à comprendre la fonction des domaines où les mutations ont été identifiées et livrer de précieux indices quant à la spécificité et la fonction cellulaire de MTM1 ainsi que les raisons du développement de la XLCNM chez l'Homme.

La seconde question à laquelle j'ai tenté de répondre est : « **Quelles sont les différences de fonction entre MTM1 et MTMR2 qui expliquent leurs implications dans deux pathologie distinctes ?** ». En effet, leur apparente similarité (65% d'identité) ainsi que leur activité phosphatase équivalente dissimule des fonctions cellulaires distinctes. Par ailleurs des mutations dans MTMR2 n'affectent pas directement le muscle contrairement à MTM1. Bien qu'ubiquitaires toutes les deux, des mutations dans le gène *MTMR2* sont responsables d'un désordre du système nerveux périphérique, en particulier de la gaine de myéline entourant les axones. Cette spécificité tissulaire des deux myotubularines n'est pas clairement comprise.

Là aussi, j'ai réalisé une analyse comparative dans la levure pour tenter de comprendre leurs fonctions intracellulaires distinctes.

Pour conclure avec cette introduction, je dirais que, d'un avis personnel, il est tout aussi légitime d'utiliser la levure *S. cerevisiae* pour étudier une protéine impliquée dans une maladie musculaire que d'analyser le rôle d'une protéine ayant une fonction muscle-spécifique dans des cellules tumorales utérines cultivées depuis plus de 40 ans.



## ❖ PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION

### I. La myotubularine MTM1

#### A. MTM1 a une fonction cellulaire indépendante de son activité 3-phosphatase

La myotubularine MTM1 possède une activité phosphatase à l'encontre de deux phospholipides membranaires : le **phosphatidylinositol 3-phosphate** (PtdIns3P) et le **phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate** (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>). L'analyse des différences au niveau cellulaire entre l'expression de myotubularine MTM1 sauvage ou mutantes de patients atteints de myopathie XLCNM montrent que seule l'expression d'une myotubularine MTM1 présentant une activité catalytique phosphatase induit une morphologie anormale du compartiment lysosomal et un défaut du trafic membranaire endocytique. Le dosage des PPIIn substrats de MTM1 (PtdIns3P et PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) montre que certaines mutations de MTM1 induisant des types sévères de myopathies n'altèrent pas l'activité phosphatase de MTM1 *in vivo* chez *S. cerevisiae*. Nous avons ainsi obtenu une corrélation directe entre les phénotypes observés chez *S. cerevisiae* (morphologie vacuolaire) et l'activité phosphatase des différents mutants de MTM1. En revanche, nous n'avons pas observé de corrélation entre l'activité phosphatase et la sévérité de la XLCNM. Par conséquent, ces résultats suggèrent que l'activité phosphatase de MTM1 ne serait pas directement responsable de la maladie. Ce résultat extrêmement surprenant a été confirmé par Leonela AMOASII dans le laboratoire de notre collaborateur Jocelyn LAPORTE (IGBMC, Illkirch) chez une souris « knock-out » *Mtm1*. En effet, la transduction de myotubularines mutantes catalytiquement inactives dans des souris *Mtm1* KO à l'aide de vecteurs AAV (adeno-associated virus) restaure en grande partie les phénotypes associés à la XLCNM.

Les résultats sur cette partie du projet sont présentés dans l'article qui suit (en révision dans Plos Genetics) et rassemblent non seulement mes analyses de MTM1s dans *S. cerevisiae* mais également de nombreux résultats obtenus chez la souris par Leonela AMOASII au cours de nos thèses. Cette étude explore la fonction de la myotubularine MTM1 dans deux modèles eucaryotes distincts et offre deux visions de l'analyse d'une protéine humaine :

## **Partie II : Résultats et Discussion - MTM1 a une fonction cellulaire indépendante de son activité 3-phosphatase**

- d'une part en expression hétérologue dans un système « naïf » où il est possible d'analyser les effets causés par des mutations faux-sens d'une seule myotubularine et de déterminer les principaux défauts mais qui ne sont pas nécessairement liés à la fonction muscle-spécifique de MTM1
- d'autre part, dans un des modèles les plus appropriés, la cellule musculaire de mammifère, pour comprendre la fonction cellulaire altérée par des mutations dans une protéine à spécificité musculaire mais dont certaines fonctions sont potentiellement redondantes avec treize paralogues de myotubularines.

Chaque modèle présentant ses avantages et ses désavantages, cette double analyse permet à ces deux études de se renforcer l'une l'autre et d'approfondir un peu plus nos connaissances sur les mécanismes cellulaires responsables du développement de la XLCNM.

Mes résultats sur cette partie sont présentés dans les figures 1 à 4 et S1 à S4 de l'article qui suit. Les figures 5 à 9 et S5 et S6 sont le fruit de l'excellent travail chez la souris de Leonela AMOASII dans le laboratoire de Jocelyn LAPORTE à l'IGBMC, Strasbourg. Les dosages de lipides (figures 4 et 9) ont été réalisés par Hélène TRONCHERE et Gaëtan CHICANNE, au laboratoire de Bernard PAYRASTRE à Toulouse.

Le fruit de cette collaboration entre nos trois laboratoires est présenté dans la publication suivante.

**B. Phosphatase Inactive Myotubularin Rescues X-linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice**

Leonela Amoasii<sup>#2</sup>, Dimitri L. Bertazzi<sup>#1</sup>, Hélène Tronchère<sup>3</sup>, Karim Hnia<sup>2</sup>, Ga etan Chicanne<sup>3</sup>, Bruno Rinaldi<sup>1</sup>, Belinda S. Cowling<sup>2</sup>, Arnaud Ferry<sup>5</sup>, Bruno Klaholz<sup>6</sup>, Bernard Payrastre<sup>3,4\*</sup>, Jocelyn Laporte<sup>2\*</sup> and Sylvie Friant<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular and Cellular Genetics, UMR7156, Université de Strasbourg and CNRS, 67084 Strasbourg, France

<sup>2</sup> Department of Translational Medicine, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U964, CNRS UMR7104, Université de Strasbourg, Collège de France, 67404 Illkirch, France.

<sup>3</sup> INSERM, U1048 and Université Toulouse 3, I2MC, 31432 Toulouse cedex 04, France.

<sup>4</sup> CHU de Toulouse, Laboratoire d'Hématologie, 31059 Toulouse Cedex 04, France.

<sup>5</sup> UMRS974, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

<sup>6</sup> Department of Integrated Structural Biology, IGBMC, INSERM U964, CNRS UMR7104, Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France.

\* Corresponding authors: Sylvie Friant, Tel.: (+33) 368 85 13 62, Fax: (+33) 368 85 13 65, E-mail: [S.Friant@unistra.fr](mailto:S.Friant@unistra.fr); Jocelyn Laporte, Tel.: (+33) 388 65 34 12, Fax: (+33) 388 65 32 01, Email: [jocelyn@igbmc.fr](mailto:jocelyn@igbmc.fr); Bernard Payrastre, Tel.: (+33) 531 22 41 49, Email: [bernard.payrastre@inserm.fr](mailto:bernard.payrastre@inserm.fr).

**Additional Footnotes**

# These authors contributed equally to this work.

\* These authors co-directed this work.

**Short title**

Myotubularin phosphatase-independent roles



## **Abstract**

Myotubularin MTM1 is a phosphoinositide (PPIn) 3-phosphatase mutated in X-linked centronuclear myopathy (XLCNM). We investigated the involvement of MTM1 enzymatic activity on XLCNM phenotypes. Exogenous expression of human MTM1 in yeast resulted in vacuolar enlargement, as a consequence of its phosphatase activity. Expression of mutants from patients with different clinical progression and determination of PtdIns3P and PtdIns5P cellular levels confirmed the link between vacuolar morphology and MTM1 phosphatase activity, and showed that disease severity is poorly correlated to the phosphatase activity. Viral gene transfer of phosphatase inactive myotubularin mutants (MTM1<sup>C375S</sup> and MTM1<sup>S376N</sup>) rescued most histological signs of XLCNM displayed by a *Mtm1*-null mouse, at similar levels as wild-type MTM1. Moreover, the MTM1<sup>C375S</sup> mutant improved muscle performance and restored the organization of nuclei, triads and the desmin intermediate filament network in *Mtm1*-null mice, while it did not normalize PtdIns3P levels, supporting that the PPIn phosphatase activity of MTM1 is not essential for maintaining normal fiber size and organelles positioning in skeletal muscle. These findings uncover MTM1 roles in the structural organization of muscle fibers that are independent of its enzymatic activity. Finally this work underlines that removal of enzymes should be used with care to conclude on the physiological importance of their activity.

## **Author Summary**

The X-linked centronuclear myopathy is a muscle disorder characterized by neonatal hypotonia and abnormal organelles positioning in skeletal muscle. This myopathy is due to different mutations in the MTM1 gene encoding the phosphoinositide phosphatase myotubularin. Disease-causing mutations are found all along the protein sequence and not only in the phosphatase catalytic domain. We investigated the link between myotubularin phosphatase activity and disease phenotypes. We used brewer yeast as a simple cellular model to analyze the *in vivo* phosphatase activity of different disease mutants. Our results show that mutations responsible for severe forms of myopathy are either active or inactive phosphatases. To further question this finding, we used the mice myotubularin knock-out model that reproduces faithfully the histopathological findings from human patients. Expression of phosphatase-inactive mutants improved the phenotypes of knock-out mice comparable to wild-type myotubularin. This shows that the maintenance of normal skeletal muscles is largely independent from myotubularin phosphatase activity. Moreover, it could have important implications in the design of therapeutic approaches aiming at manipulating the

phosphoinositide levels in the different disease linked to myotubularin homologues. Finally, these data call for cautiousness when manipulating such enzymes to conclude on the physiological relevance of their activity.

## **Introduction**

X-linked centronuclear myopathy (XLCNM, also called myotubular myopathy; OMIM 310400) is a recessive congenital muscle disorder affecting mainly males and due to mutations in the *MTM1* gene coding for the phosphoinositides (PPI<sub>n</sub>) phosphatase myotubularin [1]. The most severe form of XLCNM is characterised by hypotonia at birth, muscle atrophy, generalized muscle weakness and respiratory failure leading to high neonatal mortality (Jungbluth et al., 2008). Milder clinical phenotypes and progression were also reported and some are compatible with nearly normal lifespan [3]. Muscle biopsies from XLCNM patients show hypotrophic muscle fibers with an abnormal central positioning of nuclei. A mouse model lacking the MTM1 protein (*Mtm1* KO) has been characterized and reproduces the muscle mass decrease and most histopathological features of XLCNM, including muscle fibers hypotrophy and abnormal organelles positioning [4]. While the *MTM1* gene is ubiquitously expressed, skeletal muscle is the tissue mainly affected. To date almost 200 different disease-causing mutations have been identified in the *MTM1* gene [3,5-7]. Most mutations cause severe forms of the myopathy characterized by a strong decrease in the protein level, at least in fibroblasts or lymphoblasts, whereas others cause milder forms of the disease [8,9]. A very mild XLCNM phenotype was even described in a 67-year-old grandfather with a N180K missense mutation [3]. However, the genotype-phenotype correlation is not extensive and the importance of the PPI<sub>n</sub> phosphatase activity in the disease phenotype was not defined.

Myotubularin (MTM1) displays PPI<sub>n</sub> 3-phosphatase activity and converts phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) into PtdIns and phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) into PtdIns5P. The PtdIns3P phosphatase activity of myotubularin was identified in a purified protein complex in brain and confirmed *in vitro* and *ex vivo* after the isolation of the cDNA [10,11]. The catalytic site and mechanism of MTM1 resembles those of dual-specificity protein phosphatases. Indeed, mutation of the catalytic cysteine of MTM1 into serine (C375S, phosphatase-dead) totally abolished its enzymatic

## **Partie II : Résultats et Discussion - Phosphatase Inactive Myotubularin Rescues X-linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice**

activity [12-14]. PtdIns3P produced by the PtdIns 3-kinase hVPS34/Vps34, is enriched at early and late endosomes and is essential for endosomal protein sorting and trafficking, autophagy and proper morphology of the endosomal compartment in human and yeast cells (for a review see (Backer, 2008)). PtdIns3P is also produced by class II PtdIns 3-kinases in multicellular eukaryotes, while these kinases are absent in yeasts [16,17]. PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, the other substrate of MTM1, is generated from PtdIns3P by the 5-kinase PIKfyve/Fab1. The absence of PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> resulting from impairment of PIKfyve activity in mammalian cells, or from *FAB1* gene deletion in yeast *S. cerevisiae*, leads to a swollen or enlarged endosomal/lysosomal compartment associated with retrograde endosomal trafficking defects (for a review see (Dove et al., 2009)).

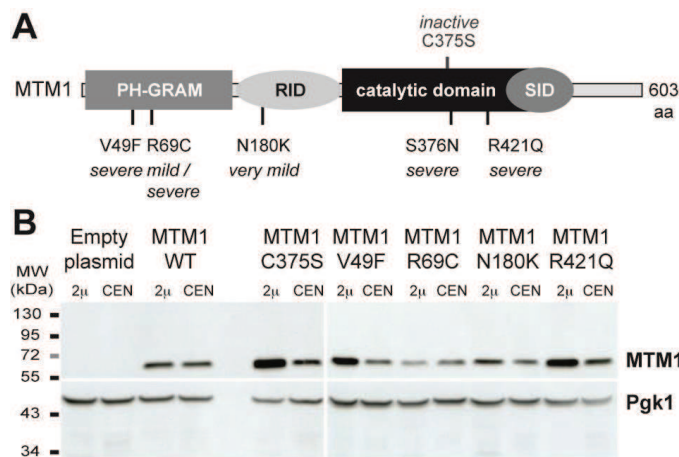
The study of MTM1 in human cells is hampered by the presence of highly conserved paralogues, termed MTMR for myotubularin related proteins. There are thirteen MTMR proteins (MTMR1 to MTMR13), seven of which are active phosphatases while the other six are dead phosphatases lacking key catalytic residues. *S. cerevisiae* contains only one member of the myotubularin family, Ymr1 (yeast myotubularin related-1) encoded by the *YJR110W* gene [19,20]. Ymr1 displays PtdIns 3-phosphatase activity *in vitro* and *in vivo* and deletion of the *YMR1* gene leads only to minor phenotypes [12,21].

The aim of this study is to understand the importance of the MTM1 PPIn phosphatase activity in the phenotype and severity of the disease. We first analyzed at the cellular level the functional impact of MTM1 mutations isolated from patients using yeast *S. cerevisiae ymr1Δ* deletion strains. Among the described mutations in *MTM1*, we have chosen to enzymatically characterize missense mutations affecting different MTM1 domains that lead to severe, mild or very mild XLCNM forms. We then analyzed the morphology of the vacuolar/lysosomal compartment, the subcellular distribution of these proteins and the intracellular levels of the different PPIn. The yeast results show that some disease mutants display phosphatase activity. In parallel, we performed rescue experiments for the XLCNM-like phenotypes displayed by the *Mtm1* KO mice using adeno-associated viral gene transfer of murine wild-type, phosphatase-inactive C375S or S376N constructs. Taken together, our data show that phosphatase-inactive MTM1 mutants rescued the phenotypes of knock-out mice suggesting that myotubularin displays phosphatase-independent functions to maintain normal skeletal muscles.

## Results

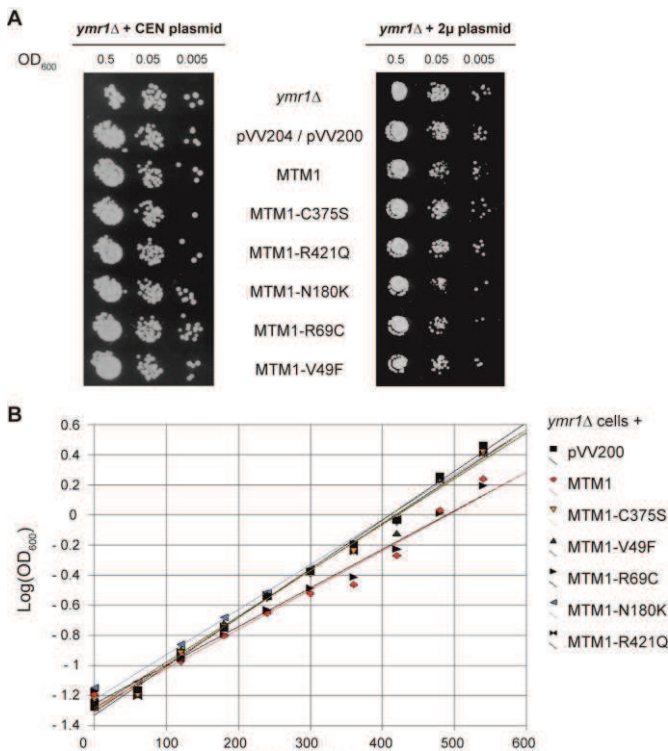
### Expression of human Myotubularin MTM1 in yeast impairs vacuolar morphology

We analyzed in yeast *S. cerevisiae* the expression of four missense mutations in *MTM1*, two affecting the PPIin interaction PH-GRAM domain (MTM1<sup>V49F</sup> and MTM1<sup>R69C</sup>), one the protein-protein interaction domain RID (MTM1<sup>N180K</sup>) and one the phosphatase catalytic domain (MTM1<sup>R421Q</sup>), leading respectively to severe, mild or severe (depending on the family), very mild, and severe XLCNM forms (Figure 1A) [3,5,6,22]. We used as controls the wild-type MTM1 and the artificial phosphatase-dead MTM1<sup>C375S</sup> mutant [12]. The different MTM1 constructs were expressed into the *ymr1Δ* yeast mutant from either low (CEN) or high (2 $\mu$ ) copy number plasmids. Growth curves (optical density of liquid cultures as a function of time) as well as drop tests revealed that none of the plasmids induced a significant growth defect and that only cells expressing MTM1 or MTM1<sup>R69C</sup> showed a slight growth delay (Figure S1). The Western blot analysis shows that the different human MTM1 proteins were produced at the expected molecular weight (70 kDa) and that protein levels in cells transformed with CEN plasmids were lower than in cells transformed with 2 $\mu$  plasmids (Figure 1B). Nonetheless, there were differences in the levels of the different MTM1 produced. Indeed, mutants having little or no effect on growth, like the phosphatase-dead MTM1<sup>C375S</sup>, were most abundant while mutants delaying growth, like MTM1<sup>R69C</sup>, were least abundant suggesting that yeast cells regulate the production of the exogenous human proteins.



**Figure 1. Human Myotubularin expression in yeast *S. cerevisiae*.** (A) Representation of the MTM1 protein with its domains, the position of the mutations analyzed and the severity of the resulting myopathy phenotype. MTM1 displays different domains, PH-GRAM (pleckstrin homology-glucosyltransferase, Rab-like GTPase activator and myotubularin), RID (Rac-induced recruitment domain), catalytic phosphatase domain and SID (SET-protein interaction domain). (B) Anti-MTM1 Western-blot on yeast protein extracts. The *MTM1* gene was placed under the control of the tetracycline-repressible *tetO* promoter in

the low copy number centromeric plasmid (CEN, pVV204, 1 to 3 copies per cell). In the high copy number 2 $\mu$  plasmid (2 $\mu$ , pVV200, 20 to 50 copies per cell), the *MTM1* gene was under the control of the strong yeast *PGK1* promoter. These different plasmids were transformed into the *ymr1Δ* yeast mutant. Protein extracts of *ymr1Δ* cells transformed with pVV204 (CEN) or pVV200 (2 $\mu$ ) empty plasmids (Control) or bearing the different MTM1 forms were analyzed by Western-blot. MTM1 production was detected with the mouse monoclonal 1G6 anti-MTM1 antibody. The different human MTM1 proteins were produced at the expected molecular weight (70 kDa) as compared to the *ymr1Δ* cells transformed with empty control plasmids that displayed no signal. Protein loading was evaluated by immunodetection of the yeast endogenous 3-phosphoglycerate kinase Pgk1 protein.



**Figure S1. Analysis of growth upon MTM1 expression in *ymr1*Δ yeast cells.** (A) Drop test growth assays on *ymr1*Δ mutant yeast cells transformed or not with pVV204 (CEN, expression) or pVV200 (2μ, overexpression) plasmids bearing the different MTM1 proteins. Mid-log phase cultures of the indicated yeast cells were serially diluted to the indicated OD<sub>600</sub> and spotted onto YPD medium. Growth was evaluated after 2 days of incubation at 30°C. (B) Growth curves of *ymr1*Δ cells bearing pVV200 (2μ) plasmid either empty or coding for different MTM1 forms. Cell concentrations were measured by OD<sub>600nm</sub> at the indicated time after incubation at 30°C. The growth curve corresponds to the logarithmic curve.

The expression of *MTM1* in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* induced an enlarged vacuolar phenotype [13,23]. This was also observed upon expression of *MTMR3* in *S. cerevisiae* and the enlarged vacuolar phenotype was correlated with *MTMR3* PPin 3-phosphatase activity [24]. We stained the vacuolar membrane with the lipophilic fluorescent dye FM4-64 in *ymr1*Δ cells upon *MTM1* or *MTM1*<sup>C375S</sup> production (pVV204, CEN) or overproduction (pVV200, 2μ). Wild-type yeast cells show unilobar vacuoles, whereas the *ymr1*Δ mutant displayed small multilobar vacuoles (Figure 2). In contrast, *MTM1* overproduction resulted in larger cells with a small or large unilobar vacuole, whereas *MTM1*<sup>C375S</sup> overproduction resulted in no obvious change in cell morphology (Figure 2A).

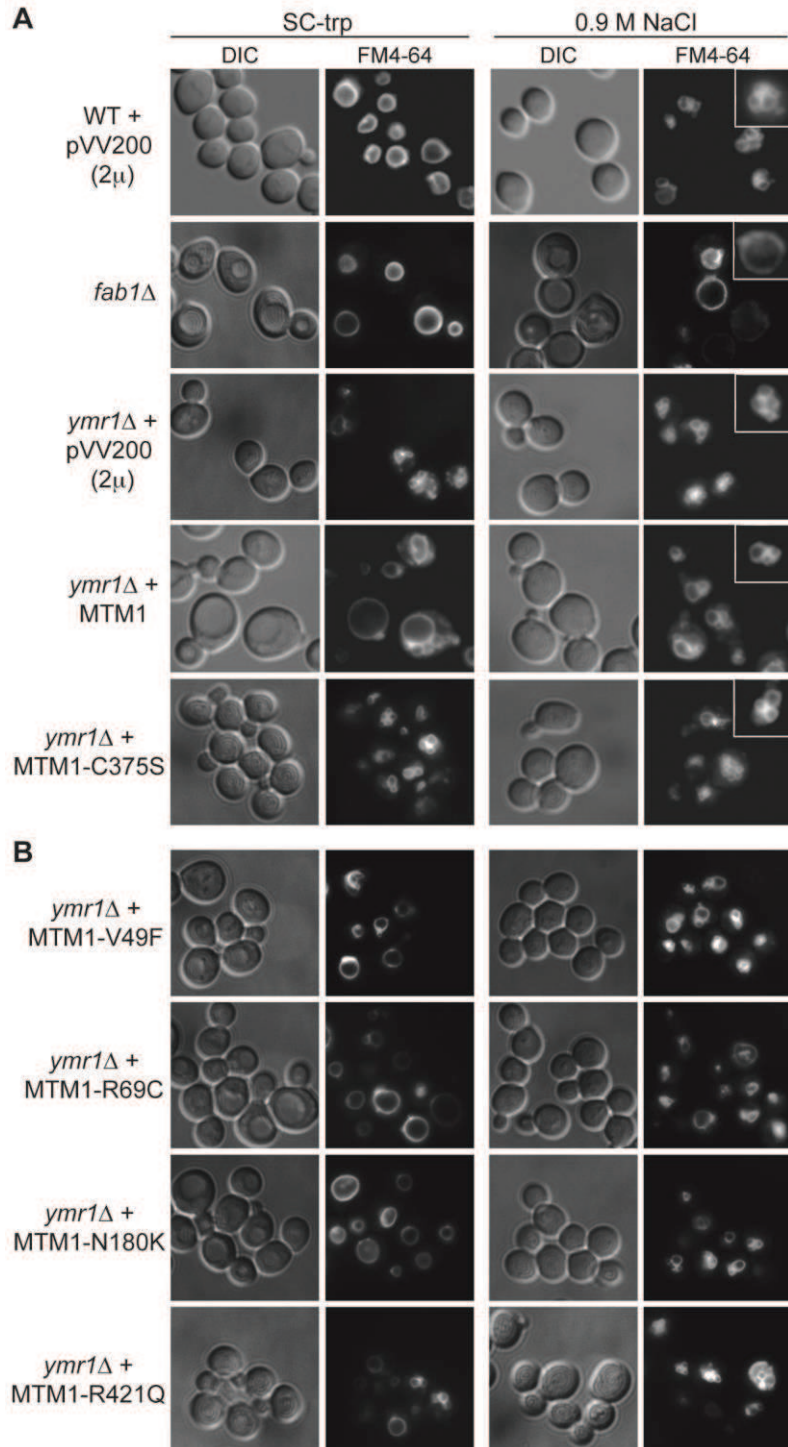
The vacuolar morphologies were classified by microscopic observation into three categories: large unilobar or giant,

small one or two lobes and more than two lobes or fragmented vacuoles (Figure 3). A significantly higher percentage of cells with abnormally large vacuoles was observed upon *MTM1* production and this was increased with overproduction, whereas this percentage was low for *MTM1*<sup>C375S</sup> and similar to the empty plasmid controls (Figure 3).

The enlarged vacuole phenotype could be due to the 3-phosphatase activity of *MTM1* or to loss of *Fab1* kinase functions upon *MTM1* production. Indeed, the *fab1*Δ mutant also displays the enlarged vacuole phenotype (Figure 2A) [25]. Osmotic stress in wild-type yeast results in vacuolar fragmentation (Figure 2A), due to stimulation of *Fab1* kinase activity [26,27]. The *ymr1*Δ cells producing either *MTM1* or phosphatase-dead *MTM1*<sup>C375S</sup> displayed fragmented

## Partie II : Résultats et Discussion - Phosphatase Inactive Myotubularin Rescues X-linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice

vacuoles upon osmotic shock, whereas in the *fab1Δ* mutant vacuoles remained enlarged (Figure 2A), indicating that overproduction of MTM1 did not block the Fab1 kinase activity. A similar result was previously obtained with *S. cerevisiae* cells expressing human *MTMR3* [24]. These results show that MTM1 phosphatase activity is directly responsible for the enlarged vacuole phenotype observed in yeast cells. Thus, analysis of vacuolar morphologies can be used to assess the MTM1 enzymatic activity of mutants found in XLCNM patients.



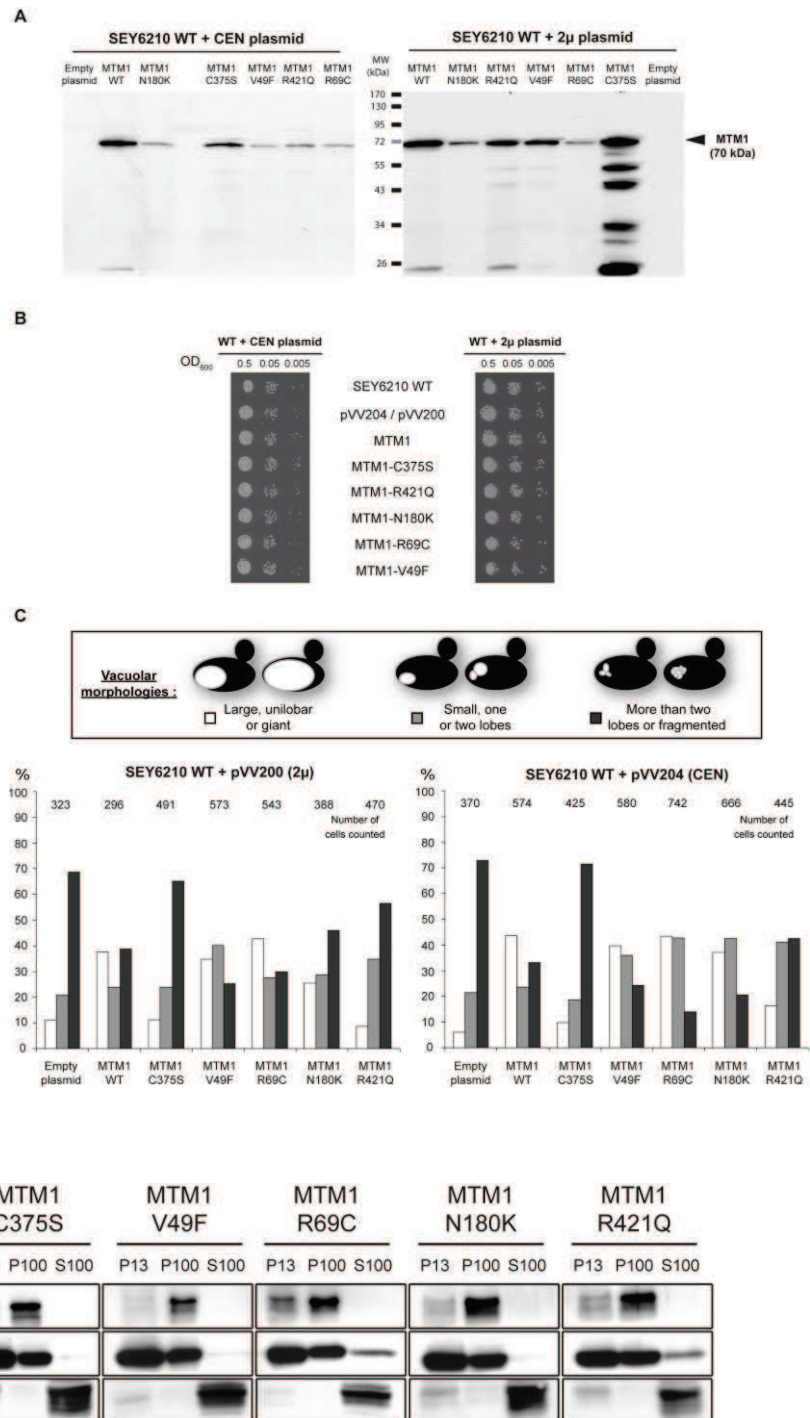
**Figure 2. Yeast vacuolar phenotype analysis upon MTM1 expression.** The wild-type and *fab1Δ* cells were used as controls. The different yeast cells transformed or not with pVV200 (2μ, overexpression) plasmids bearing or not wild-type or mutants MTM1 were grown to exponential phase in selective SC-trp medium and the vacuoles were stained by FM4-64. Cells were labeled with FM4-64 for 15 min at 25°C in YPD and washed in once in SC-trp. Cells were then observed in selective medium by fluorescence microscopy with DIC (Nomarski) and TRITC (FM4-64) filters. Osmotic shock was induced by addition of NaCl (final concentration 0.9 M) to FM4-64 stained cultures, and cells were observed after 10 min incubation. **(A)** Wild-type, *fab1Δ* and *ymr1Δ* yeast cells transformed with pVV200 empty plasmid or bearing wild-type MTM1 or the phosphatase-dead MTM1<sup>C375S</sup> mutant. Inset shows an increased magnification of a representative cell to illustrate the vacuolar phenotype upon osmotic shock. **(B)** *ymr1Δ* cells transformed with pVV200 plasmid bearing the different MTM1 mutants responsible for XLCNM myopathy.

### **Differential impact of XLCNM patient *MTM1* mutations on yeast vacuolar morphology**

The vacuolar morphology of the *ymr1Δ* mutant expressing or overexpressing the four *MTM1* constructs with XLCNM mutations was analyzed (Figure 1A). Many cells producing *MTM1*<sup>V49F</sup>, *MTM1*<sup>R69C</sup> and *MTM1*<sup>N180K</sup> displayed enlarged vacuoles (Figure 2B). Producing or overproducing the *MTM1*<sup>R421Q</sup> in the *ymr1Δ* mutant did not result in major changes in vacuolar morphology, suggesting that this mutation strongly impairs the enzymatic activity *in vivo*. Upon production (CEN) and overproduction (2μ) of *MTM1*<sup>V49F</sup> or *MTM1*<sup>N180K</sup>, the percentage of cells with small and large unilobar vacuoles increased as observed for *MTM1* (Figure 3). Thus *MTM1*<sup>V49F</sup> and *MTM1*<sup>N180K</sup> responsible for severe and very mild forms of XLCNM respectively display a phosphatase activity *in vivo*. Production (CEN and 2μ) of *MTM1*<sup>R69C</sup> resulted in similar or higher numbers of enlarged vacuoles as compared to *MTM1* (Figure 3). As for *MTM1*, osmotic stress also induced fragmentation of the vacuole in cells expressing the different *MTM1* with XLCNM mutations (Figure 2B) confirming that Fab1 kinase activity was not impaired. To determine whether similar enlarged vacuolar phenotypes were also observed in wild-type yeast cells (WT SEY6210) upon *MTM1* expression, we analyzed the vacuolar morphology of WT cells transformed with pVV200 or pVV204 empty plasmids or coding for *MTM1* or the different *MTM1* mutants (Figure S2). The expression of the *MTM1*, *MTM1*<sup>V49F</sup>, *MTM1*<sup>R69C</sup> and *MTM1*<sup>N180K</sup> constructs induced an increase in the vacuolar size in both WT and *ymr1Δ* mutant cells, showing that this phenotype was not specific for the latter yeast mutant cells. Taken together, our data show that the vacuolar phenotypes induced by the different *MTM1* mutants are not reflecting the severity of XLCNM phenotypes.

The enlarged vacuolar phenotypes observed upon production of various *MTM1* proteins in yeast cells suggest that these human phosphatases have access to their membranous PPI<sub>n</sub> substrates. To determine their intracellular distribution, protein extracts from *ymr1Δ* cells producing the different *MTM1* proteins were subjected to subcellular fractionation to separate the membrane fractions P13 and P100 from the cytosolic fraction S100 (Figure S3). *MTM1* was found mainly in P13 and P100 fractions and a similar fractionation was observed for the different *MTM1* mutants. This membrane association of *MTM1*, despite the absence of a transmembrane domain or a lipid anchor, suggests that *MTM1* interacts with lipids or proteins independently of its phosphatase activity since *MTM1*<sup>C375S</sup> was also membrane-associated.

**Figure S2.** Analysis of vacuolar morphology upon MTM1 expression in wild-type yeast cells. **(A)** Anti-MTM1 Western-blot on wild-type yeast protein extracts. Protein extracts of wild-type yeast cells transformed or not with pVV204 (CEN, expression) or pVV200 (2 $\mu$ , overexpression) empty plasmids or bearing the indicated MTM1 constructs were analyzed by Western-blot with the monoclonal 1G6 anti-MTM1 antibody. Degradation products could be seen associated to high expression. **(B)** Mid-log phase yeast cells cultures of wild-type (WT) yeast strain transformed or not with pVV204 (CEN) or pVV200 (2 $\mu$ ) plasmids bearing the different MTM1 forms were serially diluted to the indicated OD<sub>600</sub> and spotted on YPD plates. Growth was evaluated after 2 days of incubation at 30°C. **(C)** Quantification of the different vacuolar morphologies observed in wild-type yeast cells (SEY6210 WT) producing MTM1, MTM1<sup>C375S</sup>, MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup>, MTM1<sup>N180K</sup> or MTM1<sup>R421Q</sup> on either pVV204 (CEN, expression) or pVV200 (2 $\mu$ , overexpression) plasmid. For each strain, 300 to 600 cells were observed by microscopy (DIC and FM4-64) and sorted into one of the three categories: unilobar large or giant (in white), small one or two lobes (in grey) and more than two lobes or fragmented (in black) vacuoles. A scheme representing these three classes of vacuolar phenotypes is presented at the top of the graph. Histograms show the proportion of each class in the different transformed yeast cells.

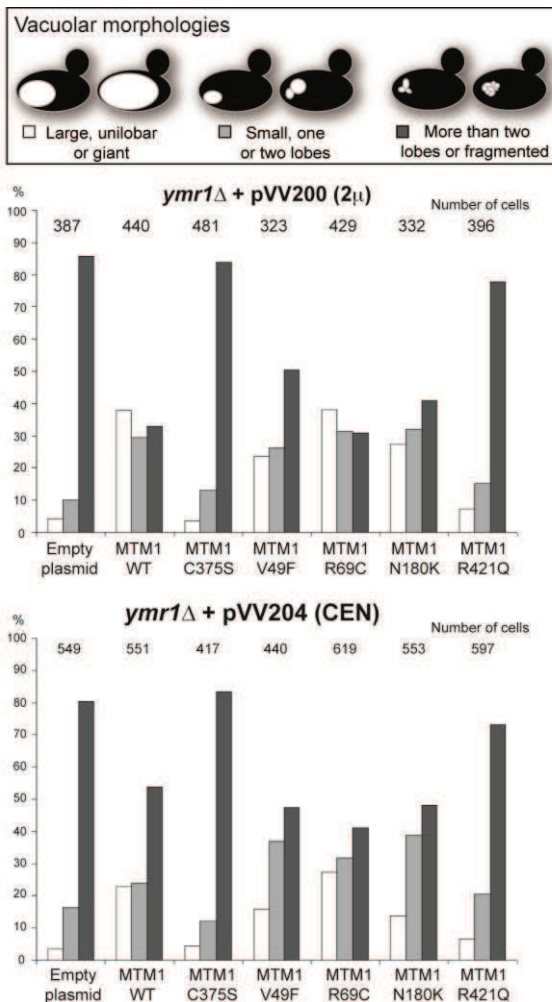


**Figure S3. Subcellular distribution of the different MTM1 mutants.** Total yeast protein extracts of *ymr1 $\Delta$*  cells expressing wild-type MTM1 or the different mutants from pVV204 (CEN) were subjected to differential centrifugation. P13 and P100 pellet fractions represent the high-density membrane fractions, and the supernatant S100 the soluble fraction. Equivalent amounts of proteins were loaded, separated by SDS-PAGE and analyzed by western-blot. MTM1 was detected with mouse monoclonal 1G6 antibodies. The transmembrane sorting receptor Vps10 and the cytosolic 3-phosphoglycerate kinase Pgk1 were used as markers.



These results show that the different vacuolar phenotypes observed upon production of the different MTM1 proteins are not due to differences in their subcellular distribution.

### The phosphatase activity of several MTM1 mutants poorly correlates with the disease severity



**Figure 3. Vacuolar morphologies quantification in yeast cells producing MTM1.** The *ymr1Δ* cells expressing either wild-type MTM1 or the different MTM1 mutants from either pVV200 (2μ, overexpression) or pVV204 (CEN, expression) plasmid were analyzed. For each strain, 300 to 600 cells were observed by microscopy (DIC and FM4-64) and sorted into one of the three categories: unilobar large or giant (in white), small one or two lobes (in grey) and more than two lobes or fragmented (in black) vacuoles. The main vacuolar phenotype of the non-transformed *ymr1Δ* mutant cells is fragmented vacuoles with more than two lobes. Histograms are the mean of three independent experiments and show the proportion of each category in the different transformed yeast cells.

The vacuolar phenotypes suggest that MTM1, MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup> or MTM1<sup>N180K</sup> dephosphorylate PtdIns3P and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> in yeast cells. To assess their phosphatase activity *in vivo* we determined the intracellular levels of PtdIns3P and PtdIns5P in *ymr1Δ* cells producing the different MTM1 constructs. Cells were labeled with <sup>32</sup>P, lipids extracted and separated by thin-layer chromatography (TLC) and spots corresponding to phosphatidylinositol-monophosphates (PtdInsP) and phosphatidylinositol-bisphosphates (PtdInsP<sub>2</sub>) were isolated, deacylated and resolved by anion-exchange HPLC chromatography. Four different PPIIn are identified in yeast *S. cerevisiae*: PtdIns3P, PtdIns4P, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> and PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. The relative abundance of [PtdIns3P, PtdIns4P, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>] is 40:40:7:13 in wild-type

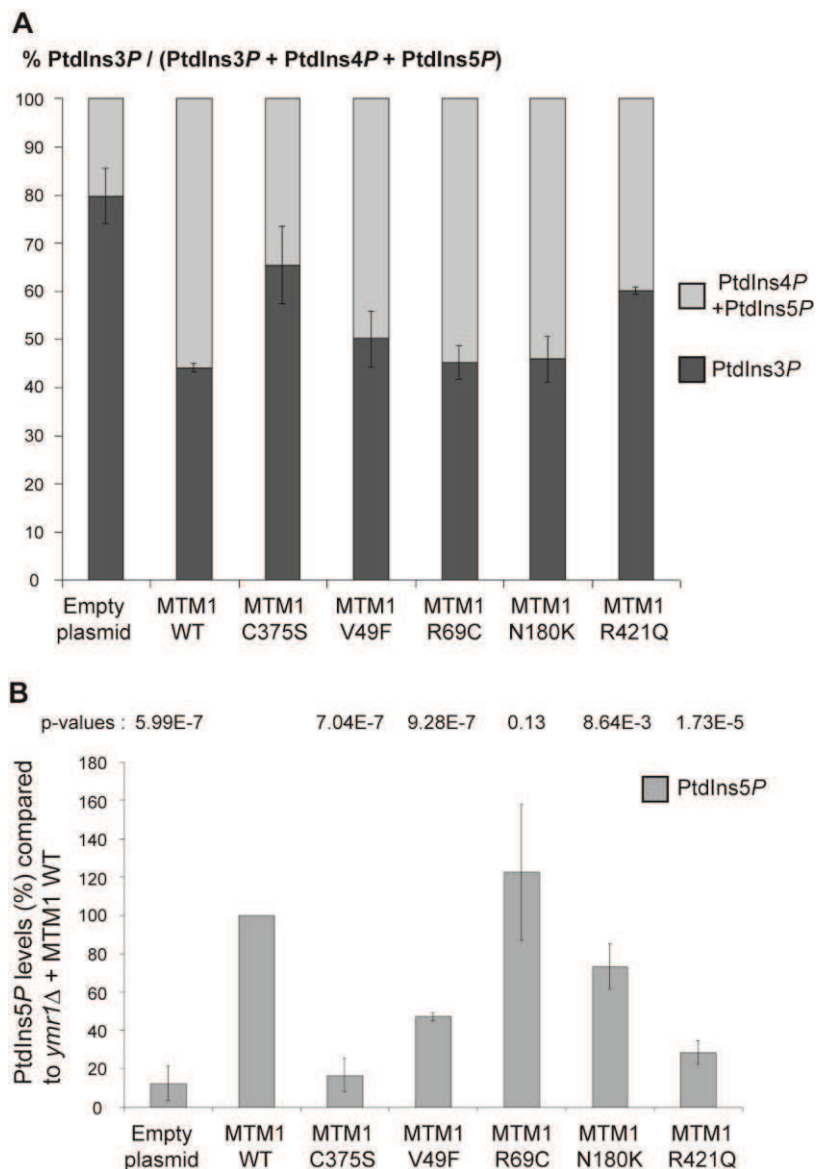
SEY6210 strain whereas in *fab1Δ* mutant strain this ratio changes to 74:21:0:5 [25]. It was previously shown that in *ymr1Δ* cells PtdIns3P levels are 2-fold higher than in wild-type cells and represent 82% of the total PtdInsP species [12]. To compare the phosphatase activity of the different MTM1 constructs, we calculated the percentage of PtdIns3P in total PtdInsP for the different strains (Figure 4A). This shows that

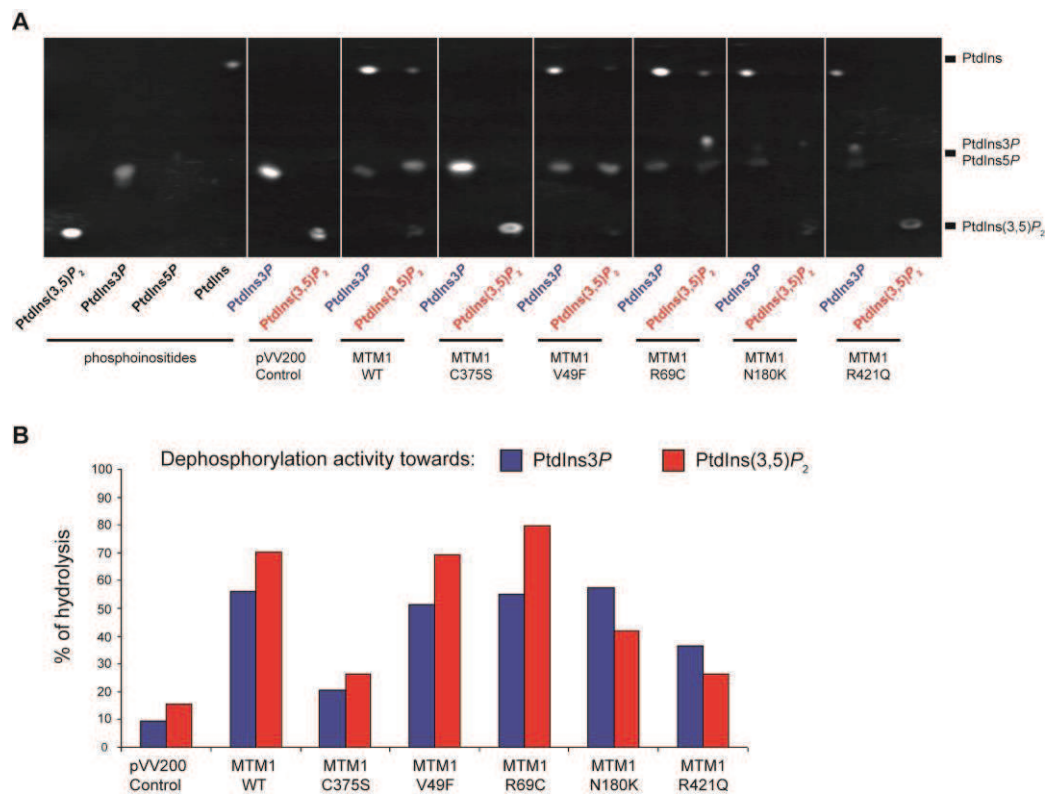
## Partie II : Résultats et Discussion - Phosphatase Inactive Myotubularin Rescues X-linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice

MTM1<sup>R421Q</sup> mutant affecting a residue in the catalytic pocket displayed a poor phosphatase activity, as PtdIns3P levels were comparable to those of the phosphatase-dead MTM1<sup>C375S</sup> control. In contrast, the three other XLCNM patient mutants MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup> and MTM1<sup>N180K</sup> showed PtdIns3P phosphatase activity comparable to the wild-type MTM1, as they displayed a strong decrease in the PtdIns3P levels which represented only 45-50% of total PtdInsP (Figure 4A). These results were confirmed by *in vitro* phosphatase assays [28] done on MTM1, MTM1<sup>C375S</sup>, MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup> and MTM1<sup>N180K</sup> proteins immunisolated from yeast *ymr1Δ* cells (Figure S4).

**Figure 4.** Determination of different phosphoinositides (PPI) levels upon expression of MTM1 wild-type or mutant proteins. **(A)** Quantification of PtdIns3P cellular levels of *ymr1Δ* cells expressing wild-type MTM1 or the different mutants from pVV204 (CEN). Strains were grown to early log phase in selective medium, labeled with <sup>32</sup>P and lipids were extracted and prepared for HPLC analysis. Based on HPLC chromatograms the peak area corresponding to each PPI species was determined and results were expressed as the percentage of <sup>32</sup>P-PtdIns3P compared to the total labeled <sup>32</sup>P-PtdInsP. Results are represented as the mean of at least two independent experiments shown with standard deviations. **(B)** Quantitative analysis of PtdIns5P produced in *ymr1Δ* cells expressing wild-type or mutants MTM1. Strains were grown to log phase in selective medium, lipid were extracted, separated by TLC and spots corresponding to mono-phosphorylated PPI were scrapped off and subjected to phosphorylation by PtdIns5P 4-kinase type IIα in presence of [γ-<sup>32</sup>P]-ATP. This kinase is specific for PtdIns5P and produces PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. The <sup>32</sup>P-labeled PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> generated from this *in vitro* kinase reaction was further

analyzed by TLC and radioactivity was quantified in a scintillation counter. The total amount of PtdIns5P (pmol) in each sample was determined by comparison with a calibration curve made from diC16-PtdIns5P and normalized to the number of yeast cells. Graph represents PtdIns5P as a percentage of production compared to the wild type myotubularin MTM1 (n=3 to 4 experiments). The p-value for each construct was evaluated versus the wild type MTM1 and is indicated at the top of the graph. A p-value of less than 0.05 indicates that the difference in the two PtdIns5P percentages is statistically significant. The p-value was 0.0021 for MTM1<sup>V49F</sup> versus MTM1<sup>C375S</sup> and 0.0036 for MTM1<sup>V49F</sup> versus MTM1<sup>R421Q</sup>.





**Figure S4. *in vitro* phosphatase activity assays on the different MTM1 mutants.** Yeast protein extracts from *ymr1Δ* cells transformed with pVV200 (overexpression) plasmid either empty or coding for wild type MTM1 protein or the different mutants were subjected to anti-MTM1 immunoprecipitation. After control by anti-MTM1 Western-blot, comparable amounts of MTM1 were tested for *in vitro* phosphatase activity using fluorescent C6-BODIPY®-FL-PPIn, according to (Taylor and Dixon, 2001) and [2]. (A) The products of the enzymatic reaction were separated by TLC (Thin Layer Chromatography) allowing the different PPIn species (PtdIns, PtdIns monophosphate and PtdIns bisphosphate) to migrate at a different height. Fluorescent PtdIns, PtdIns3P, PtdIns5P (barely detectable) and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> were spotted on the TLC and used as controls for the TLC migration (phosphoinositides). The TLC plate was revealed under a UV table. (B) Percentage of hydrolysis of the fluorescent phosphoinositide substrates (PtdIns3P in blue and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> in red) are reported for each

Among the different PPIn detected in yeast cells, the PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> is the least abundant and represents about 0.10% of the total inositol phospholipids (Dove et al., 2009). Indeed, HPLC chromatograms of PtdInsP<sub>2</sub> showed that under our experimental conditions PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> was barely detectable in normal conditions for the different strains (not shown). PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> intracellular levels can be increased by osmotic shock (Dove et al., 1997). To avoid any osmotic stress treatment of the cells and to detect PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> dephosphorylation by MTM1 under normal conditions, we quantified the resulting product PtdIns5P by a sensitive mass assay [28,29]. Thus *ymr1Δ* yeast cells producing MTM1, MTM1<sup>C375S</sup>, MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup>, MTM1<sup>N180K</sup> and MTM1<sup>R421Q</sup> were grown to exponential phase, lipids were extracted and separated by TLC, and spots corresponding to PtdInsP were extracted and submitted to an *in vitro* kinase assay to detect PtdIns5P. The *ymr1Δ* cells expressing

## **Partie II : Résultats et Discussion - Phosphatase Inactive Myotubularin Rescues X-linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice**

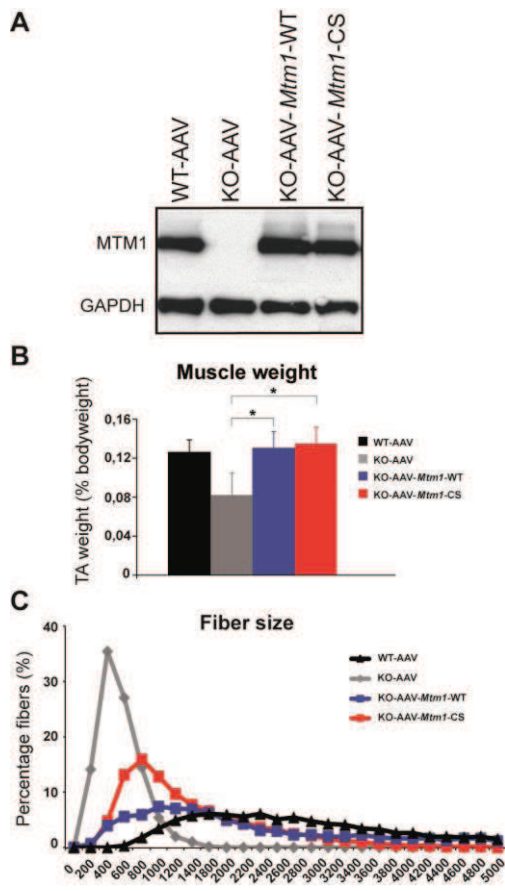
MTM1<sup>C375S</sup> or the empty plasmid showed a basal level of PtdIns5P, whereas in the presence of active MTM1 there was a strong increase in PtdIns5P (Figure 4B). Comparison of PtdIns5P levels showed that MTM1<sup>R421Q</sup> can be considered as an inactive phosphatase, as it displayed similar levels to MTM1<sup>C375S</sup> (Figure 4B). The three other XLCNM patient mutants MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup> and MTM1<sup>N180K</sup> displayed a PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> phosphatase activity since significant quantities of PtdIns5P were detected (Figure 4B). Based on the p-values (Figure 4B), the PtdIns5P production by the MTM1<sup>R69C</sup> mutant is not significantly different than the one detected for MTM1. These results were further confirmed by *in vitro* phosphatase assays showing proper dephosphorylation of PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> by MTM1, MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup> and MTM1<sup>N180K</sup> produced in yeast *ymr1Δ* cells, whereas in the same conditions the MTM1<sup>C375S</sup> and MTM1<sup>R421Q</sup> were less active (Figure S4).

These results led to the following classification of the different MTM1 proteins analyzed according to their *in vivo* PtdIns3P and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> phosphatase activities going from the most to the least active: MTM1<sup>R69C</sup>, MTM1, MTM1<sup>N180K</sup>, MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R421Q</sup> and the phosphatase-dead control MTM1<sup>C375S</sup>. This same classification was obtained when using the enlarged vacuolar phenotypes induced by the production of these proteins in yeast cells (Figure 3), confirming the direct connection between the vacuolar phenotypes and MTM1 enzymatic activity. However, the classification of the different MTM1 proteins from the mildest forms of myopathy to the most severe leads to the following: MTM1<sup>N180K</sup>, MTM1<sup>R69C</sup>, MTM1<sup>V49F</sup> and MTM1<sup>R421Q</sup>. This shows that, despite having phosphatase activities comparable to wild-type MTM1, several mutants are associated with severe forms of XLCNM leading to strong muscle weakness and neonatal death.

### **Exogenous expression of myotubularin ameliorates the histological phenotype of Mtm1 KO muscle independently of its enzymatic activity**

As results in yeast suggested that the phosphatase activity of myotubularin does not correlate with the severity of the XLCNM disease, we aimed to investigate the role of the phosphatase activity on the development of the XLCNM phenotype *in vivo*. We tested the potential of the MTM1<sup>C375S</sup> phosphatase-dead mutant to rescue the XLCNM-like muscle phenotype of *Mtm1* knockout (KO) mice compared to wild-type MTM1 using Adeno-associated virus (AAV) gene transfer. We used the constitutive *Mtm1* KO mouse that develops a homogeneous XLCNM in the 129PAS background [30]. These mutant animals show a progressive muscle weakness starting clinically at 3 weeks of age and leading to death

by 7 to 9 weeks, probably from respiratory failure. They display most phenotypes observed in



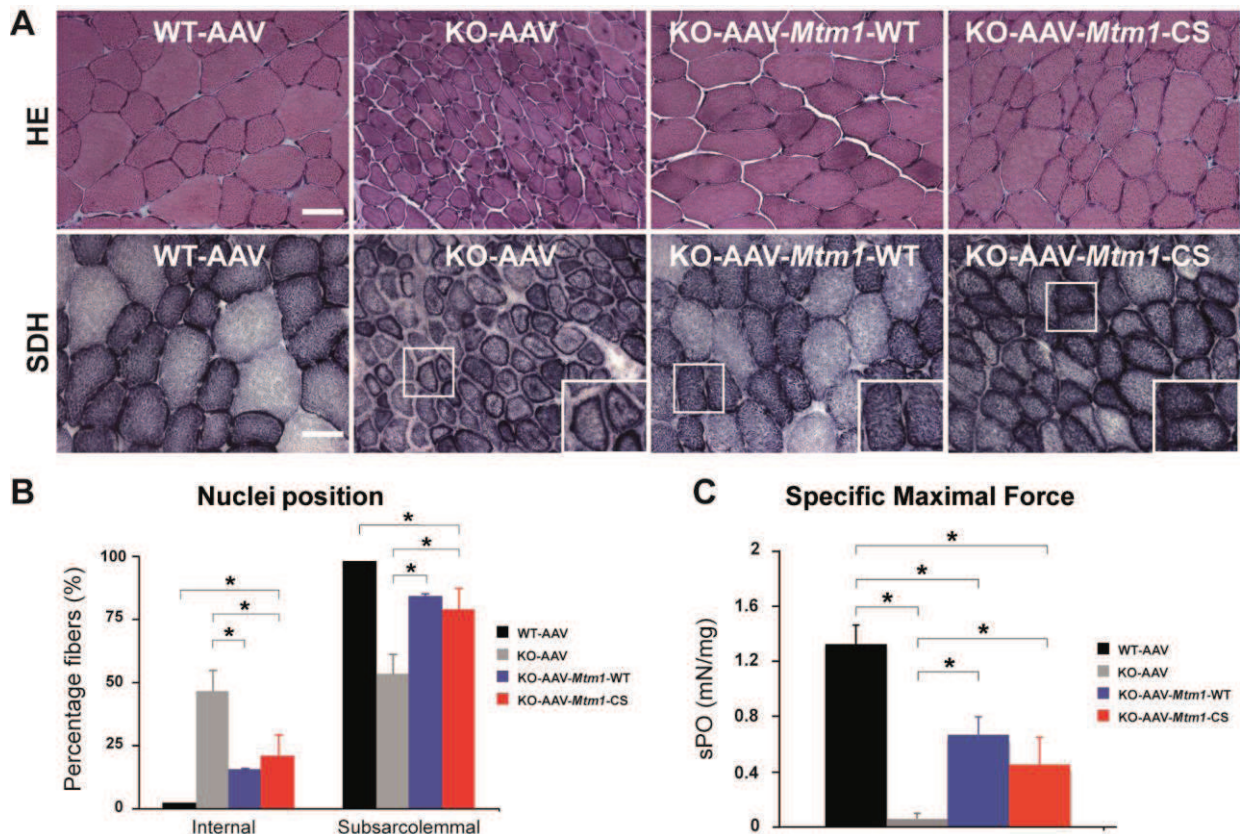
**Figure 5. Correction of muscle atrophy and fiber hypotrophy in a murine model of centronuclear myopathy by AAV-mediated expression of the phosphatase-dead myotubularin mutant MTM1<sup>C375S</sup>.** (A) Skeletal muscle protein lysates 4 weeks post-injection (PI) were immunoblotted for MTM1 and GAPDH levels in WT and *Mtm1* KO mice injected with empty AAV, *Mtm1* KO injected with AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS. (B) Graph represents TA weight as a percentage of total body weight (n=15 mice). P values 0.000374 for KO injected with AAV versus AAV-*Mtm1*-WT, and 0.00096 for KO injected with AAV versus AAV-*Mtm1*-CS. (C) Transverse muscle sections were analyzed for fiber area. Fiber size is grouped into 200 μm<sup>2</sup> intervals, and represented as the percentage of total fibers in each group (n=1,000 for 15 mice per group, using different batches of virus).

patients as a decrease in muscle mass, muscle fiber hypotrophy, nuclei and mitochondria positioning defects, desmin aggregation, and alteration in T-tubule structure. At 6 weeks old, *Mtm1* KO mice injected with empty AAV vector show a 38% decrease in the Tibialis anterior (TA) muscle weight compared to wild-type mice injected with empty AAV (Figure 5B). *Mtm1* KO TA muscles displayed smaller and rounder myofibers with increased proportion of internal nuclei compared to wild-type mice (Figure 6A). In addition, *Mtm1* KO muscles had an abnormal oxidative staining with higher intensities in the subsarcolemmal region and in the center of fibers, reminiscent of an accumulation of mitochondria at these regions (Figure 6A).

TA muscles of 2-3 weeks old *Mtm1* KO mice were injected with either AAV2/1-*Mtm1*-WT (AAV-*Mtm1*-WT) or AAV2/1-*Mtm1*-C375S (AAV-*Mtm1*-CS), where the C375S mutation abolishes the phosphatase enzymatic activity towards PPI<sub>n</sub> substrates (Figure 4). The contralateral muscle was injected with AAV2/1-Empty (AAV) as an internal control. The effect of AAV-mediated *Mtm1*-WT or *Mtm1*-CS expression was analyzed 4 weeks after injection. The level of ectopic *Mtm1*-WT and *Mtm1*-CS expression was analyzed by western blot in injected muscles. In both injected muscles the level of the protein was reestablished and similar to the levels of the endogenous protein in WT muscle (Figure 5A).

We confirmed that exogenous expression of *Mtm1*-WT in TA muscle corrects the XLCNM-like phenotype in the constitutive 129PAS *Mtm1* KO mice, as previously shown in

muscle-specific KO mice on a B6 background [31], showing that the MTM1 protein is acting



**Figure 6. The phosphatase-dead C375S myotubularin mutant corrects organelles mis-positioning and muscle force in *Mtm1* KO mice.** (A) Hematoxylin and eosin (HE, left panels, magnification X400) and succinate dehydrogenase (SDH, right panels, X400) staining of TA cross-sections from WT mice injected with empty AAV, *Mtm1* KO injected with empty AAV, AAV-*Mtm1*-WT or AAV-*Mtm1*-CS mice 4 weeks PI. *Mtm1* KO muscle sections show the presence of very small myofibers and internalized nuclei. Mitochondrial oxidative staining is abnormally accumulated at the centre of fibers. Note the recovery of oxidative reactivity pattern in *Mtm1* KO muscles expressing myotubularin WT or C375S. Scale bar: 50µm. (B) Percentage of muscle fibers with internalized nuclei after AAV, AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS injection into *Mtm1* KO mice. Nuclei were considered as internalized if not in contact with the sarcolemma. The number of fibers with internal nuclei is increased in *Mtm1* KO tibialis anterior (TA) muscle and significantly and equally reduced after injection with AAV-*Mtm1*-WT or AAV-*Mtm1*-CS (n=550; \*P<0.001). (C) The specific maximal force (sP0) of WT muscle injected with AAV and *Mtm1* KO TA muscle injected with AAV, AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS. The sP0 represents the absolute maximal force related to muscle weight (n=6 mice).

primarily in skeletal muscle and not in other tissues as only muscle was injected. The *Mtm1* KO model displays a severe muscle atrophy (Figure 5 and [4,30]). Muscles injected with AAV-*Mtm1*-CS showed a significant increase of the weight compared to *Mtm1* KO muscle injected with AAV (0,13%±0,03 for AAV-*Mtm1*-CS compared to 0,08%±0,02 for AAV alone), reaching similar levels to *Mtm1* KO injected with *Mtm1*-WT and to wild-type mice (Figure 5B). Next we investigated if the increase in weight correlates with an improvement at the histological level. Hematoxylin and eosin (HE) staining revealed similar improvement of the histological aspects of *Mtm1* KO muscles injected with either AAV-*Mtm1*-WT or AAV-*Mtm1*-CS (Figure 6A, upper panel). Quantitative analysis of the distribution of myofiber areas

showed a clear increase in fiber size for both AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS treated muscles compared to *Mtm1* KO muscles (Figure 5C). None of the constructs restored fiber area to the level of wild-type mice 4 weeks after infection and it was not possible to test if longer infection would increase the rescue of this sign under our experimental conditions as mice were dying around the age of analysis. Fiber area distribution is slightly different comparing AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS; AAV-*Mtm1*-CS leads to a higher increase in the number of fibers with an area in the range of 200 to 3200  $\mu\text{m}^2$ , compared to fibers with an area superior to 3200  $\mu\text{m}^2$  with AAV-*Mtm1*-WT. Our data show that both AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS partially but significantly rescued muscle atrophy and fiber hypotrophy of the *Mtm1* KO mice.

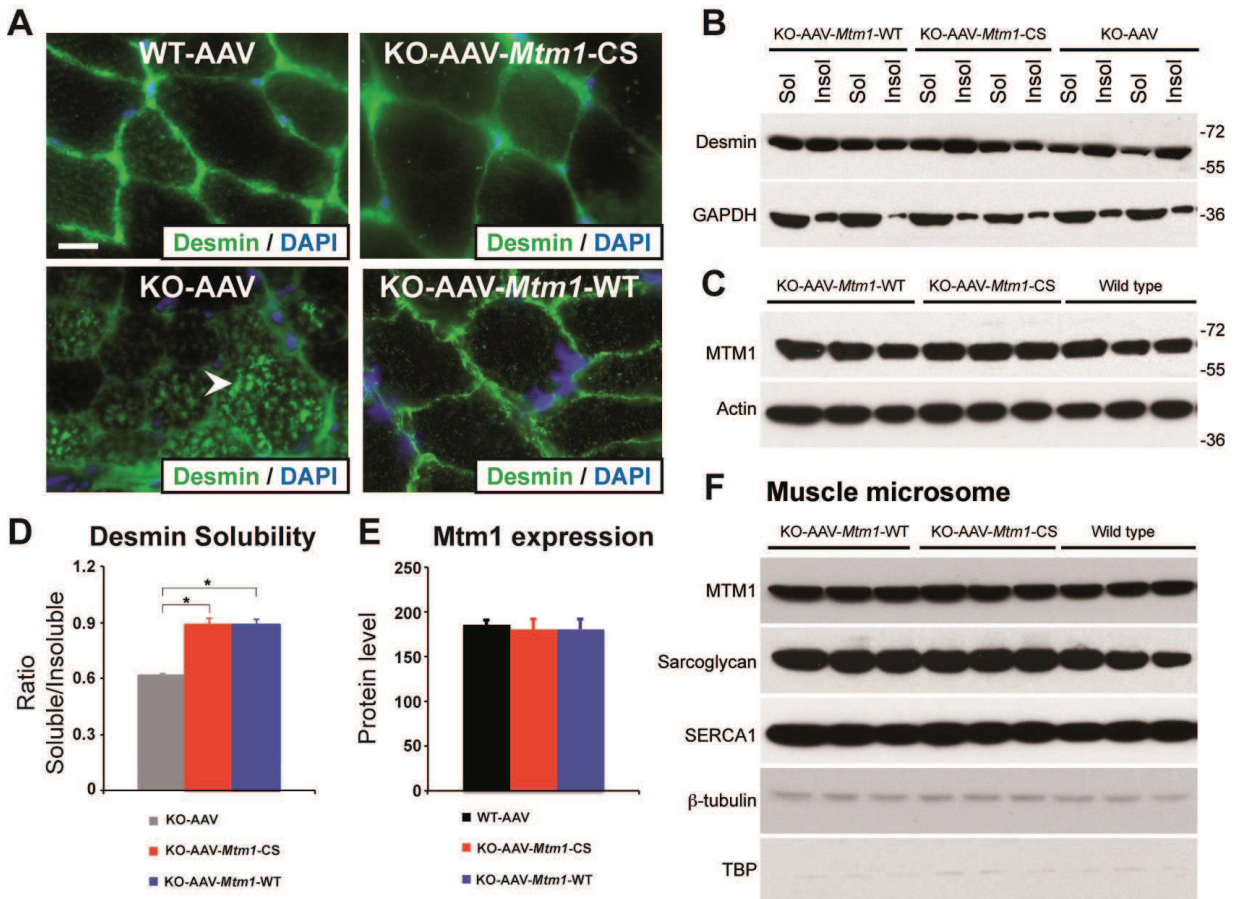
Furthermore *Mtm1* KO muscle fibers are also characterized by a progressive disorganization in the distribution of mitochondria and endoplasmic reticulum. Thus, we evaluated the localization of these organelles by succinate dehydrogenase staining (SDH) that labels the oxidative activity concentrated in these intracellular compartments. The SDH staining of muscle sections (Figure 6A, lower panel) revealed that the abnormal central concentration of oxidative activity was rescued with both AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS. In addition, abnormal internalization of nuclei represents another hallmark of the XLCNM pathology. We thus counted the number of fibers with internal nuclei (not in contact with the sarcolemma) in wild-type and *Mtm1* KO muscles injected with AAV versus *Mtm1* KO muscles treated with AAV-*Mtm1*-WT or AAV-*Mtm1*-CS (Figure 6B). We observed a strong and similar reduction of the percentage of internal nuclei in AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS treated muscles compared to *Mtm1* KO muscles (21,15%±8,23 for AAV-*Mtm1*-CS; 15,68%±0,62 for AAV-*Mtm1*-WT compared to 46,67%±8,18 for *Mtm1* KO and 2,28%±2,11 for wild-type mice).

### **The phosphatase-inactive myotubularin rescues the muscle weakness**

To determine whether the significant rescue of the histological features was associated to improved muscle performance, we measured the *in situ* force of the muscle. The isolated muscle was stimulated by the sciatic nerve, and the maximal force produced was recorded and normalized to muscle weight (Figure 6C). The specific maximal force of untreated TA muscles of 6 week-old *Mtm1* KO mice was lower by 81% compared to wild-type muscle. The muscles transduced with AAV-*Mtm1*-CS and AAV-*Mtm1*-WT exhibits an increase of the specific maximal force compared to *Mtm1* KO (0,44mN/mg±0,23 for AAV-*Mtm1*-CS; 0,66mN/mg±0,17 for AAV-*Mtm1*-WT compared to 0,06mN/mg±0,04 for *Mtm1* KO and

## Partie II : Résultats et Discussion - Phosphatase Inactive Myotubularin Rescues X-linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice

1,31mN/mg±0,21 for wild-type mice) (Figure 6C). Altogether, our results show that the MTM1<sup>C375S</sup> phosphatase-dead mutant improves most XLCNM-like histological and functional phenotypes of the *Mtm1* KO model at a level comparable to the wild-type MTM1 protein.



**Figure 7. The phosphatase-dead C375S myotubularin mutant injection in *Mtm1*-KO muscle restores normal desmin expression and localization.** (A) Ectopic expression of MTM1 transgene in *Mtm1*-KO muscle restored normal desmin localization in muscle. Arrowheads indicate aggregates of desmin in *Mtm1*-KO muscle injected with AAV. Scale bars: 10µm. (B) The phosphatase-dead C375S myotubularin mutant expression in *Mtm1*-KO muscle restored normal desmin expression level in soluble and insoluble fraction. (C) Skeletal muscle protein lysates 4 weeks post-injection were immunoblotted for MTM1. (D) Quantification of relative desmin expression level in soluble compared to insoluble fraction. Data correlated from 2 independent experiments (n = 3 mice per group). \*P ≤ 0.05. (E) Quantification of relative expression of MTM1 in WT and *Mtm1* KO mice injected with empty AAV, *Mtm1* KO injected with AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS. (F) Microsome fractions from *Mtm1* KO muscles injected with AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS and from wild-type muscles were prepared and immunoblotted for MTM1 to compare localization of MTM1-WT and MTM1-C375S in the membrane fraction of the muscle. Microsome fractions were immunoblotted with antibodies detecting membrane proteins (SERCA1 and Sarcoglycan), cytoplasmic protein (β-tubulin) and nuclear protein (TATA-box binding protein (TBP)).

### MTM1<sup>C375S</sup> phosphatase-dead mutant restores the abnormal desmin organization in *Mtm1*-deficient muscle

To further decipher the molecular basis for these phosphatase-independent improvements we analyzed the localization of desmin, a muscular MTM1 protein interactor.



Indeed, it was recently shown that MTM1 binds specifically desmin and regulates the filament assembly and organization [32]. Desmin is the major component of intermediate filaments (IFs) cytoskeleton of muscle, which plays a central role in the integration of structure and function of striated muscle by linking the contractile apparatus to the sarcolemmal cytoskeleton as well as to several cytoplasmic organelles and the nucleus. Desmin is found mainly in the Z-disk in a normal skeletal muscle. In the muscle biopsies from XLCNM patients, desmin localization is altered. The *Mtm1* KO mice muscles present an accumulation of aggregates that disrupt the continuity and organization of the desmin network (Figure 7A). We could previously show that ectopic expression of MTM1-WT in the *Mtm1* KO muscle restores the normal organization of the desmin network [32]. We examined the muscle injected with the MTM1<sup>C375S</sup> phosphatase-dead mutant. The muscle transduced with AAV-*Mtm1*-CS exhibited a clear improvement of the desmin localization compared to the desmin aggregates observed in the *Mtm1* KO muscle injected with the empty virus (Figure 7A). Furthermore, the mislocalization of desmin in *Mtm1* KO corresponds also to a shift in desmin equilibrium from the soluble to the insoluble fraction, indicating a defect in the desmin assembly process (Figure 7B). We observed a significant and similar increase in the desmin solubility in AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS treated muscles compared to *Mtm1* KO muscles (Figure 7B). To confirm that AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS displayed similar efficiency regarding the correction of desmin solubility we analyzed the level of MTM1 expression in the same samples (Fig. 7C). The MTM1 expression was similar in both type of muscles suggesting that phosphatase-dead mutant MTM1<sup>C375S</sup> improves the desmin organization as efficiently as MTM1. Moreover, we analyzed the distribution of MTM1-WT and MTM1-C375S in the membrane fraction of skeletal muscle using a microsomal preparation from *Mtm1* KO muscles injected with AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS and from wild-type muscle. Microsomal fractions were analyzed using protein markers for the membrane fraction ( $\alpha$ -sarcoglycan and SERCA1), for the cytoplasmic ( $\beta$ -tubulin) and for the nuclear fractions (the TATA-box binding protein (TBP)). The MTM1-WT and MTM1-C375S proteins ectopically expressed in the *Mtm1*-KO muscle were similarly distributed in the microsomal fractions (Figure 7F). These results suggest that MTM1-WT and MTM1-C375S localize similarly in the membrane fraction in skeletal muscle.

Altogether, our results show that the phosphatase activity of MTM1 is not required for normal desmin localization in muscle fibers, and suggest that maintenance of the desmin network is a phosphatase-independent function of MTM1 that is important in XLCNM.

### **Correction of the ultrastructural organization of triads in *Mtm1* KO muscles**

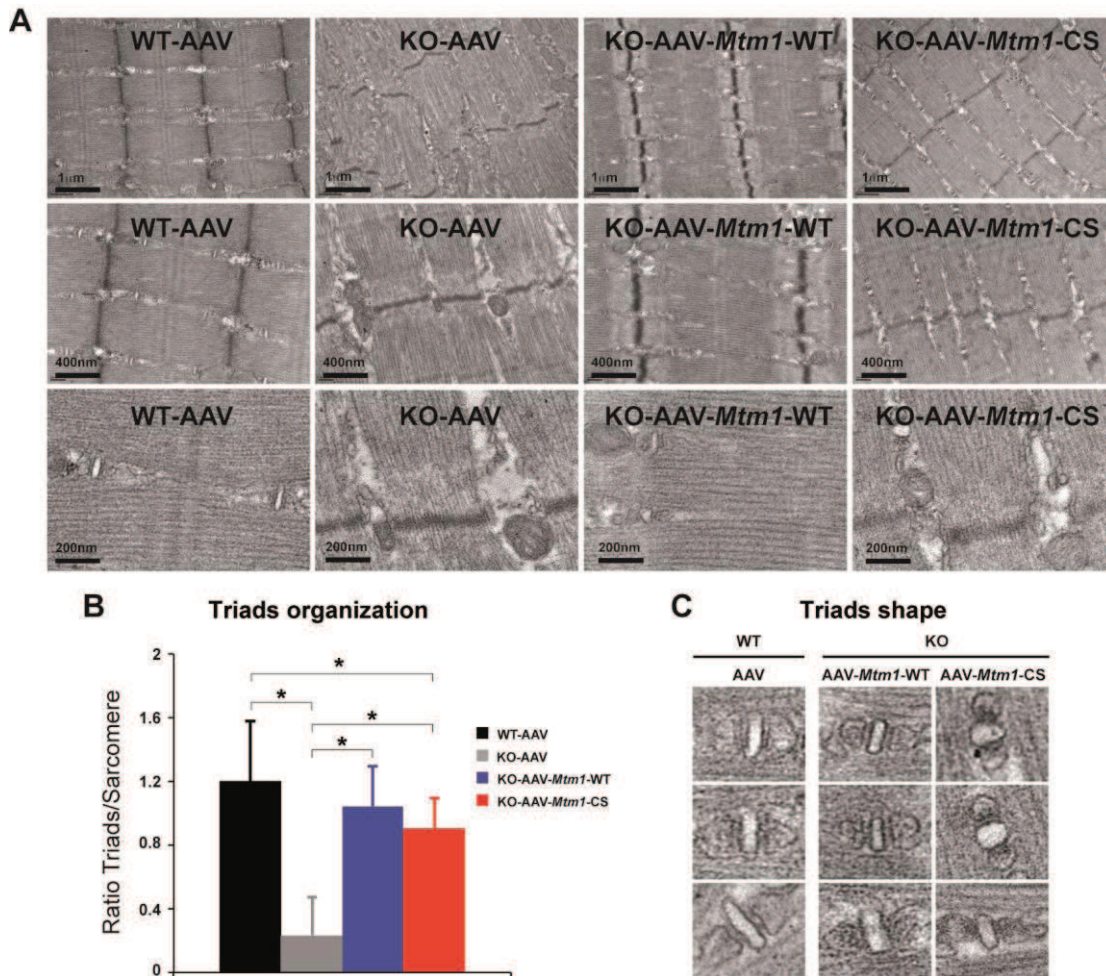
To determine whether the substantial rescue of the histological features was correlated to the improvement of the structural organization of the triads, we analyzed the muscles by electron microscopy. Indeed, previous studies have shown that the muscles lacking myotubularin as well as XLCNM muscle biopsies present abnormal organization of triads [30,33]. The electron micrographs obtained from the wild-type, *Mtm1* KO and *Mtm1* KO injected with AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS muscles were analyzed. The wild-type muscle showed proper organization of the fibers with the sarcomere arrangement and the typical triad structure. In contrast, the micrographs from *Mtm1* KO muscle exhibited sarcomere disorganization and a decrease in the number of well-positioned triads (Figure 8A and 8B). Interestingly, the *Mtm1*-KO muscle injected with AAV-*Mtm1*-WT showed a clear improvement in the general organization of the sarcomere and the presence of the well-formed triads (Figure 8A-C). An improvement was also observed in the *Mtm1* KO muscle injected with the AAV-*Mtm1*-CS. The ratio of triads per sarcomere in *Mtm1* KO muscles of 6 weeks-old mice was decreased by 83% compared to wild-type muscle. Muscles transduced with AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS presented a significant increase in this ratio ( $0,9 \pm 0,18$  for AAV-*Mtm1*-CS;  $1,04 \pm 0,24$  for AAV-*Mtm1*-WT compared to  $0,23 \pm 0,21$  for *Mtm1* KO and  $1,2 \pm 0,3$  for wild-type mice) (Figure 8B). In addition, the shape of the triad was analyzed in the wild-type and in the *Mtm1*-KO muscle transduced with AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS. The *Mtm1* KO was not considered for this analysis, as recognizable triads were nearly absent in this muscle. The muscle transduced with the dead-phosphatase mutant exhibited recognizable triads with a slightly different shape than the muscle transduced with the AAV-*Mtm1*-WT and wild-type muscle (Figure 8C).

Altogether, our results show that the MTM1<sup>C375S</sup> phosphatase-dead mutant improves the general organization of the muscle fibers and the triads in the *Mtm1* KO model at a level comparable to the wild-type MTM1 protein. However the muscle transduced with AAV-*Mtm1*-CS exhibited a qualitative difference in the shape of the triads compared to the AAV-*Mtm1*-WT suggesting a potential role of the phosphatase activity in the shape of the triad.

**The rescuing potential of the phosphatase-dead mutant is very likely not due to substrate-trapping properties**

## Partie II : Résultats et Discussion - Phosphatase Inactive Myotubularin Rescues X-linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice

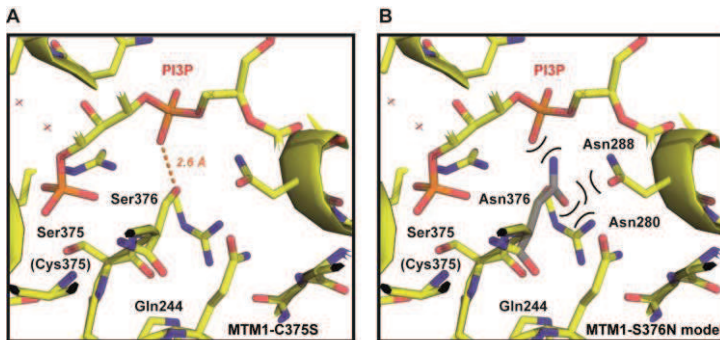
We cannot exclude that the  $MTM1^{C375S}$  mutant might act as a dominant negative substrate-trap by blocking the access of effectors to  $PtdIns3P$  and/or  $PtdIns(3,5)P_2$ , even



**Figure 8. Correction of triad abnormalities present in *Mtm1* deficient muscles with AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS.** (A) Sarcomere and triad organization in wild-type muscle, *Mtm1* KO muscle, *Mtm1* KO muscles injected with AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS at 3 different magnifications. Muscles from *Mtm1* KO demonstrate a severe disorganization of the muscle fiber with lack of recognizable triads within the sarcomere structure. (B) Quantification of the presence of triads in the muscle fibers. The graph represents the ratio between the number of triads observed in each longitudinal section divided by the total number of sarcomeres present in the section. (C) Triads shape in wild-type muscle, and *Mtm1* KO muscles injected with AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS.

though this seems unlikely since in yeast this mutant does not induce any of the vacuolar phenotypes observed with the wild-type construct (Figure 3). To address this issue, we used the  $MTM1^{S376N}$  (*Mtm1*-SN) mutant associated to severe XLCNM [34]. The S376N mutation located in the catalytic site abrogates the *in vitro* phosphatase activity [12] and this inactive mutant was predicted to disrupt the substrates binding based on the myotubularin MTMR2 crystal structure [35]. Indeed, the replacement of this serine 376 with a bulkier aminoacid removes the hydrogen bond formed with the oxygen of the D1 phosphate of the lipid substrate and is also predicted to produce an allosteric clash with both the D1 phosphate of the substrate and with two aminoacids of the catalytic pocket (Asp280 and Asp288, Figure S5). We

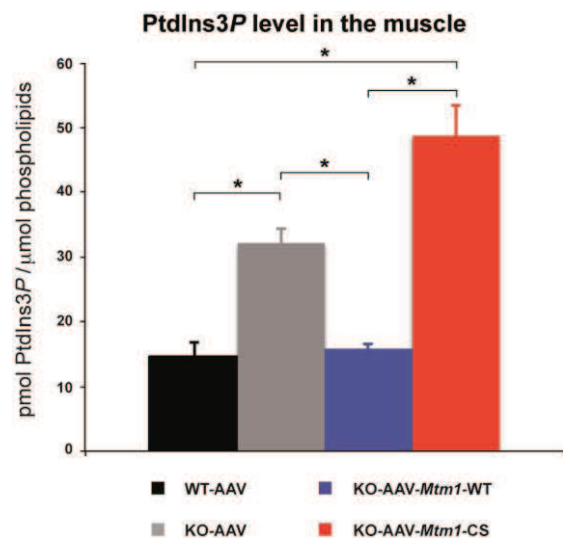
analyzed the major XLCNM-like phenotypes in the *Mtm1* KO muscle injected with AAV-*Mtm1*-SN mutant. The *Mtm1* KO muscles transduced with AAV-*Mtm1*-CS and AAV-*Mtm1*-WT showed a clear improvement of the muscle concerning the muscle weight, fiber size, organelle and nuclei positioning and a similar rescue was observed for the injection of AAV-*Mtm1*-SN mutant (Figure S6). This strongly suggests that the corrections of the XLCNM phenotypes described for AAV-*Mtm1*-CS are not due to a substrate-trap effect of the C375S mutation.



**Figure S5. Model of MTM1-C375S and MTM1-S376N.** The crystal structure of MTMR2 (PDB accession number 1ZSQ) was used to model the MTM1 catalytic pocket that shares the same amino acids. The figure was prepared with the PyMOL software (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.1 Schrödinger, LLC.). (A) MTM1-C375S model. (B) MTM1-S376N model.

### The phenotypic rescue does not correlate with normalization of PtdIns3P levels

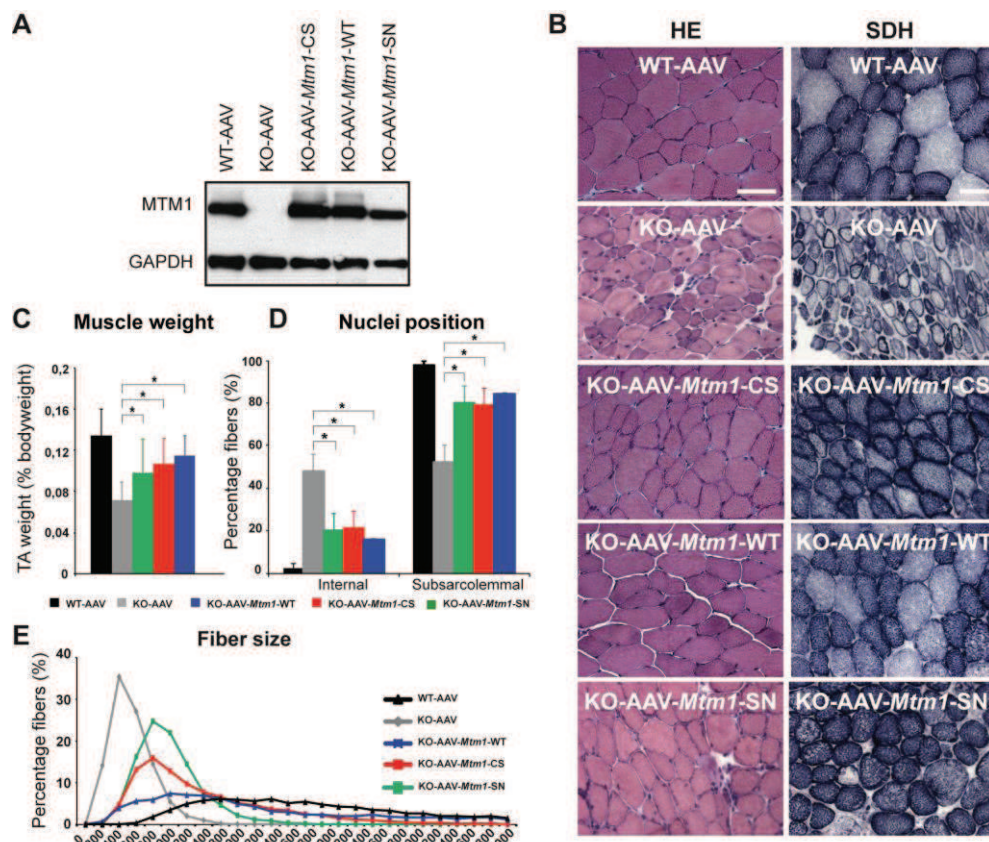
To determine whether the MTM1 phosphatase activity contributed to the rescue of the XLCNM phenotypes, we measured the level of PtdIns3P in the different muscles. For these measurements, we extracted total lipids from the tibialis anterior of wild-type, *Mtm1*-KO and *Mtm1*-KO muscles injected with AAV-*Mtm1*-WT or AAV-*Mtm1*-CS. We used a novel sensitive mass assay for measuring PtdIns3P from total muscle lipid extracts without metabolic labeling (Chicanne and Payrastra, manuscript submitted). The level of PtdIns3P in the sample was quantified and normalized to total phospholipids, the data were expressed as pmol of PtdIns3P/μmol of phospholipids (Figure 9). The lipid extracts from *Mtm1* KO mice exhibited a higher level of PtdIns3P compared to wild-type (32,15±3,07 for *Mtm1* KO and 14,69±2,82 for wild-type muscle). These data support the conclusions that PtdIns3P is a physiological substrate of MTM1 in



**Figure 9.** MTM1-WT but not MTM1-C375S normalizes PtdIns3P levels in the injected muscles. Lipids were extracted from wild-type, *Mtm1* KO, and *Mtm1*-KO injected with AAV-*Mtm1*-WT and AAV-*Mtm1*-CS tibialis anterior muscles and PtdIns3P levels were quantified. The results were presented as the levels of PtdIns3P to the total phospholipids. The graphs represent the mean of two independent experiments shown with the standard deviation. \* $p < 0.05$ .

## Partie II : Résultats et Discussion - Phosphatase Inactive Myotubularin Rescues X-linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice

mammalian muscle and that the disease is paralleled by an alteration of PPI<sub>n</sub> metabolism in the *Mtm1* KO model. The lipid extracts from the muscles transduced with AAV-*Mtm1*-WT showed a normalization of the PtdIns3P to similar levels as for wild-type muscle ( $15,81 \pm 0,93$  for AAV-*Mtm1*-WT muscle). In contrast, muscles transduced with AAV-*Mtm1*-CS exhibited, as the *Mtm1* KO muscles, higher levels of PtdIns3P compared to the wild-type muscle ( $48,8 \pm 6,7$  for AAV-*Mtm1*-CS) (Figure 9). This shows that the *Mtm1*-C375S mutant is catalytically inactive *in vivo*. The correction of the phenotypes with the MTM1<sup>C375S</sup> dead-phosphatase was not correlated to normalization of PtdIns3P levels in muscle. These results support the conclusion that the MTM1 phosphatase activity does not contribute to the maintenance of the XLCNM phenotypes.



**Figure S6. Correction of muscle atrophy and fiber hypotrophy in a murine model of centronuclear myopathy by AAV-mediated expression of the phosphatase-inactive myotubularin mutant MTM1<sup>S376N</sup>.** (A) Skeletal muscle protein lysates 4 weeks post-injection were immunoblotted for MTM1 and GAPDH levels in WT and *Mtm1* KO mice injected with empty AAV, *Mtm1* KO injected with AAV-*Mtm1*-WT, AAV-*Mtm1*-CS and AAV-*Mtm1*-SN. (B) Hematoxylin and eosin (HE, left panels, magnification X400) and succinate dehydrogenase (SDH, right panels, X400) staining of TA cross-sections from WT mice injected with empty AAV, *Mtm1* KO injected with empty AAV, AAV-*Mtm1*-WT, AAV-*Mtm1*-CS and AAV-*Mtm1*-SN mice 4 weeks PI. *Mtm1* KO muscle sections show the presence of very small myofibers and internalized nuclei. Mitochondrial oxidative staining is abnormally accumulated at the centre of fibers. Note the recovery of oxidative reactivity pattern in myotubularin-expressing *Mtm1* KO muscles. Scale bar: 50μm. (C) Graph represents TA weight as a percentage of total body weight (n=6 mice). P values 0.0000374 for KO injected with AAV versus AAV-*Mtm1*-WT, 0.00096 for KO injected with AAV versus AAV-*Mtm1*-CS and 0.0001 for KO injected with AAV versus AAV-*Mtm1*-SN. (D) Percentage of muscle fibers with internalized nuclei after AAV, AAV-*Mtm1*-WT, AAV-*Mtm1*-CS and AAV-*Mtm1*-SN injection of *Mtm1* KO mice. Nuclei were considered as internalized if not in contact with the sarcolemma. The number of fibers with internal nuclei is increased in *Mtm1* KO tibialis anterior (TA) muscle and significantly and equally reduced after injection with AAV-*Mtm1*-WT or AAV-*Mtm1*-CS or AAV-*Mtm1*-SN. (n=550; \*P<0.001). (E) Transverse muscle sections were analyzed for fiber area. Fiber size is grouped into 200 μm<sup>2</sup> intervals, and represented as the percentage of total fibers in each group (n=1,000 for 15 mice for AAV-*Mtm1*-WT, AAV-*Mtm1*-CS and 6 mice for AAV-*Mtm1*-SN group).

## **Discussion**

**In this study, we investigated the involvement of MTM1 enzymatic activity on the phenotypes of XLCNM. Using heterologous expression of human genes in yeast, we showed that the PPI<sub>n</sub> phosphatase activity of MTM1 was directly linked to vacuolar homeostasis. The vacuolar phenotypes induced by expressing different patient MTM1 mutants and their measured impact on PPI<sub>n</sub> levels poorly correlated with disease severity. In addition, using gene transfer in a murine model of XLCNM, we could rescue most morphological phenotypes with two different phosphatase-inactive mutants of MTM1. Altogether, our data strongly suggest that the main role of MTM1 in adult muscle is largely independent of its enzymatic activity.**

We report here a sensitive assay to determine human MTM1 phosphatase activity in yeast *S. cerevisiae* using vacuole size as a read-out. We showed that vacuole size correlates with the levels of intracellular PtdIns3P and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> dephosphorylated by MTM1. In yeast cells, a reverse correlation was observed between the *in vivo* phosphatase activity and the MTM1 protein level. Indeed, the enzymatically inactive MTM1<sup>R421Q</sup> and MTM1<sup>C375S</sup> are the most produced whereas the most active MTM1<sup>R69C</sup> was the least abundant (Figure 1B). This suggests that yeast cells regulate the levels of human MTM1 to avoid massive deregulation of PPI<sub>n</sub> levels. This regulation could be post-transcriptional since the same effect was observed with two different replication origins (2μ or CEN-ARS) combined with two different promoters, the yeast *PGK1* and the bacterial *tetO* promoters. Thus, an equilibrium between intracellular protein levels and PtdIns3P and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> dephosphorylation rates may have been reached to ensure yeast growth in the presence of human MTM1 active forms. This is further supported by the fact that despite being massively produced in yeast, enzymatically active MTM1 did not drastically deplete intracellular PtdIns3P but restored similar PtdIns3P levels to the SEY6210 WT strain. It may also reflect a specificity of MTM1 towards distinct intracellular subpools of PtdIns3P.

Using different approaches in two eukaryotic models, the yeast *S. cerevisiae ymr1Δ* and the *Mtm1* KO mouse, our results indicate that the XLCNM disease is not solely linked to a defect in MTM1 phosphatase activity. In yeast cells, several XLCNM patient mutants responsible for severe forms of the disease displayed a phosphatase activity comparable to wild-type MTM1. In this model, the MTM1 phosphatase activity was linked to vacuolar

## **Partie II : Résultats et Discussion - Phosphatase Inactive Myotubularin Rescues X-linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice**

homeostasis, in accordance with the known function of PtdIns3P and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> in yeast cells (Dove et al., 2009). In the *Mtm1* KO mice AAV gene transfer of wild-type MTM1 or phosphatase-inactive MTM1<sup>C375S</sup> and MTM1<sup>S376N</sup> mutants significantly improved the XLCNM-phenotypes. Interestingly, mice were injected with MTM1<sup>C375S</sup> or MTM1<sup>S376N</sup> at 3 weeks after the appearance of some pathological signs, supporting that these inactive phosphatases did not only rescue but were also able to revert the progression of the disease. Thus, even though the phosphatase activity of MTM1 is very important for its cellular function likely by impacting on vesicular trafficking, the loss of this activity is not responsible for the maintenance of most muscle phenotypes observed in the disease. This strongly suggests that defects in PPIIn metabolism and vacuolar homeostasis are not the main cause in the maintenance of XLCNM phenotypes. However, we do not exclude the possibility that defect of the MTM1 PPIIn phosphatase activity may participate to the onset of the disease. Kiger and colleagues reported that downregulation of PI3K class II (Pi3K68D) in drosophila could rescue viability and several defects observed in mutant of *mtm*, the fly orthologue for MTM1, MTMR1 and MTMR2 [17,36]. It is possible that in fly the role of myotubularins are more tightly linked to the phosphatase activity than in mammals where the diversification of myotubularins may have developed some phosphatase-independent and tissue-specific functions.

Mutations responsible for XLCNM are found all along the MTM1 protein [3,6]. For most of them, including missense mutations, the MTM1 protein level was strongly decreased or not detectable in fibroblasts, lymphoblasts or myoblasts from patients, suggesting that XLCNM results in most cases from the absence or instability of MTM1 (Laporte et al., 2001). Recent results show that *Mtm1* p.R69C mice model is associated to mild CNM phenotypes with undetectable MTM1 protein levels, however full-length *Mtm1* mRNA was detected that might account for the milder phenotype compared to the *Mtm1* KO mice (Pierson et al., 2012). One exception was the MTM1<sup>S376N</sup> mutant associated to normal protein level in lymphoblast and leading to severe XLCNM [8,9]. The MTM1<sup>S376N</sup> mutant is phosphatase inactive [12]. However, the level of this MTM1 mutant was not investigated in patients' muscle, as it requires a muscle biopsy from a patient deceased a long time ago in the neonatal period, and thus it is possible that this mutation leads to the instability of the protein in muscle. As exogenous expression of this MTM1<sup>S376N</sup> mutant and of the phosphatase-dead MTM1<sup>C375S</sup> rescues muscle atrophy, fiber hypotrophy and to some extent organelles positioning defects, we conclude that these pathways are not linked to the phosphatase activity but to other functions of MTM1. Based on these new findings, we rather propose that

the MTM1 myotubularin protein might be a key effector involved in complex protein-protein interactions required for proper muscular functions. Indeed, MTM1 does not display a skeletal muscle-specific expression [38], whereas the XLCNM disease is mostly restricted to skeletal muscle. This would suggest that MTM1 plays a crucial role by interacting with muscle specific proteins and being required for their proper localization/function. Among these, the muscle-specific intermediate filament desmin involved in organelle positioning is a good candidate. Indeed, MTM1 is required for proper desmin localization and assembly and some XLCNM-causing mutations disrupt the MTM1-desmin interaction [32]. Furthermore the MTM1<sup>C375S</sup> phosphatase-dead mutant restores the abnormal desmin organization in MTM1-deficient muscle, suggesting that the phosphatase activity of MTM1 is not required for normal desmin organization and assembly in muscle fibers. Thus, the maintenance of desmin organization and IFs network is a phosphatase-independent function of MTM1 that is important for maintenance of the muscle structure and function.

Our work also shows that a disease due to mutation(s) affecting an enzyme is not always associated with loss of the corresponding enzymatic activity. Such dual function of PPI<sub>n</sub> metabolizing enzymes has been described for class I PI3K. Knock-out mice lacking PI3K protein expression show different phenotypes than knock-in mice expressing a kinase-dead mutant [39,40]. Moreover, manipulation of myotubularins or other PPI<sub>n</sub> regulatory proteins by knock-down, overexpression or specific intracellular targeting is being widely used to decipher the roles of these lipids (Varnai and Balla, 2007). Our results call for cautiousness when interpreting the observed effects as they may result from a function unrelated to their enzymatic activity.

In conclusion, our data unravel an important and novel aspect of XLCNM as we provide evidences for a scaffolding activity of MTM1 for muscle specific proteins, such as desmin, which appears more important than its phosphatase activity in the maintenance of the XLCNM pathology. Our findings have important implications in the design of therapeutic approaches aiming to manipulate the phosphoinositide level in the different diseases linked to myotubularin homologues. Whether the MTM1 phosphatase activity is also dispensable for the development of the disease and the exact link between PPI<sub>n</sub> modulation and muscle function remains to be established.



## Materials and Methods

### Ethics Statement

Animals were housed in a temperature-controlled room (19–22°C) with a 12:12-h light/dark cycle. Mice were humanely killed by CO<sub>2</sub> inhalation followed by cervical dislocation, according to national and European legislations on animal experimentation.

### Plasmids, Yeast Strains and media

The human *MTM1* ORF was cloned into pENTR<sup>TM</sup>1A plasmid (Invitrogen) to generate an entry clone. Gateway system (Invitrogen) was used to clone the different *MTM1* constructs into the yeast expression vectors pVV200 and pVV204 or into a pAAV-MCS vector.

*S. cerevisiae fab1Δ (MATα ura3Δ0, leu2Δ0, his3-Δ1, met15-Δ0, fab1::kanMX4)* mutant (EUROSCARF collection), *ymr1Δ (MATα ura3-52, leu2-3,112, his3-Δ200, trp1-Δ901, lys2-801, suc2-Δ9 ymr1::HIS3)* and WT (SEY6210 strain; *MATα ura3-52, leu2-3, 112, his3-Δ200, trp1-Δ901, lys2-801, suc2-Δ9*) cells [21] were grown at 30°C in rich medium (YPD): 1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose or synthetic drop-out medium (SC): 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose and the appropriate amino acids mixture to ensure plasmid maintenance.

### Western Blot analysis

Yeast cells were lysed by glass beads using a FASTprep<sup>®</sup> (MP Biomedicals) in PBS1X, sorbitol 0.3 M, Complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail<sup>TM</sup> (Roche Diagnostics) and PMSF 1 mM. Lysates were cleared and analyzed by SDS-PAGE and Western blot using mouse monoclonal 1G6 anti-MTM1 (1/10,000) (Laporte et al., 2001) and mouse monoclonal anti-PGK1 (1/400) (Invitrogen) antibodies. Muscles were homogenized in 50 mM Tris, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 10 mM beta-glycerophosphate, 10 mM NaF, 1 mM

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.1% SDS, 2% Triton X-100 and protease inhibitors (Roche Diagnostics) using a Polytron<sup>®</sup> homogenizer (Kinematica Inc.). Mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Chemicon) and rabbit anti-MTM1 antibody (R2868) were used for detection.

### Yeast vacuolar staining

FM4-64 (Invitrogen) staining was performed as previously described (Vida and Emr, 1995). Labeled yeast cells were observed by fluorescence microscopy (Axiovert200, Zeiss) in SC-trp medium. Cells were counted and classified into different categories: more than two lobes, small one or two lobes and unilobar large or giant vacuoles.

### Yeast phosphoinositide analysis

Labeling and lipid extraction procedures were done as previously described (Hama et al., 2000). *ymr1Δ* cells expressing MTM1 were grown for 16h in presence of 40 μCi/ml H<sub>3</sub><sup>32</sup>PO<sub>4</sub> (Perkin Elmer) before lysis by TCA. Lipids were extracted with 95% EtOH :diethyl ether :pyridine at 15 :5 :1 v/v. Samples were analyzed by TLC and labeled spots were identified by autoradiography and PPI standards. Labeled PtdIns<sub>*P*</sub> as well as PtdIns<sub>*P*</sub><sub>2</sub> were scraped off the plates, collected and deacylated before being analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) Whatman PartiSphere 5 SAX (4.6 x 125 mm) as previously described (Payrastré, 2004).

### PtdIns5P and PtdIns3P mass assay from yeast and muscle extracts

*ymr1Δ* cells producing the different MTM1 were grown to exponential phase, lipids extraction and TLC separation were performed as described above. Spots corresponding to PtdIns<sub>*P*</sub> were extracted and submitted to an *in vitro* kinase assay using recombinant PtdIns5P 4-kinase type IIα in presence of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP [28,29]. Among the different PtdIns<sub>*P*</sub>

species, this kinase specifically phosphorylates PtdIns5P to PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and the measured quantity of <sup>32</sup>P-PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> will directly represent the *in vivo* PtdIns5P intracellular levels. The total lipids from TA muscles were extracted with the Dounce homogenizer using the method of Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959) and prepared for mass assay to measure the intracellular PtdIns3P levels in muscle by a novel mass assay (Chicanne and Payrastra, manuscript submitted).

#### **Production and purification of Adeno-Associated Virus (rAAV)**

rAAV2/1 vectors were generated by a triple transfection of AAV-293 cell line with pAAV2-insert containing the insert under the control of the CMV promoter and flanked by serotype-2 inverted terminal repeats, pXR1 containing rep and cap genes of AAV serotype-1, and pHelper encoding the adenovirus helper functions. Viral vectors were purified and quantified by real time PCR using a plasmid standard pAAV-eGFP. Titers are expressed as viral genomes per ml (vg/ml) and rAAV titers used here were 5-7.10<sup>11</sup> vg/ml.

#### **AAV-transduction of wild-type tibialis anterior muscle of mice**

Two to three week-old male wild-type and *Mtm1* KO 129PAS mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 5 µl/body gram of ketamine (20 mg/ml, Virbac) and xylazine (0.4%, Rompun, Bayer). Tibialis anterior (TA) muscles were injected with 20 µl of AAV2/1 preparations, or AAV2/1 empty virus solution. Animals were housed in a temperature-controlled room (19–22°C) with a 12:12-h light/dark cycle. Mice were humanely killed by CO<sub>2</sub> inhalation followed by cervical dislocation, according to national and European legislations on animal experimentation. TA muscles were dissected 4 weeks after injection and frozen in nitrogen-cooled isopentane and liquid nitrogen for histological and immunoblot assays, respectively.

#### **Functional analysis of the muscle**

Muscle force measurements were evaluated by measuring *in situ* muscle contraction in response to nerve and muscle stimulation, as described previously. Animals were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (50 mg per kg). The distal tendon of the TA was detached and tied with a silk ligature to an isometric transducer (Harvard Bioscience, Holliston, MA). The sciatic nerve was distally stimulated, response to tetanic stimulation (pulse frequency of 50 to 143 Hz) was recorded, and absolute maximal force was determined. After contractile measurements, the animals were sacrificed by cervical dislocation. To determine specific maximal force, TA muscles were dissected and weighted.

#### **Histological and Immunofluorescence analysis of skeletal muscle**

Transverse cryosections (8 µm) of mouse TA skeletal muscles were stained with hematoxylin and eosin (HE), succinate dehydrogenase (SDH) and viewed with a fluorescence microscope (DM4000; Leica Microsystems, Sunnyvale, CA). Cross-sectional area (CSA) was analyzed on HE sections from TA mouse skeletal muscles, using the RoiManager plugin of ImageJ image analysis software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009). The percentage of TA muscle fibres with centralized or internalized nuclei was counted using the cell counter plugin of ImageJ image analysis software. Transverse cryosections (8 µm) sections of mouse TA skeletal muscles were prepared, fixed, and stained with antibodies to desmin (Santa Cruz). Nuclei were detected by costaining with Hoechst (Sigma-Aldrich) for 10 minutes. Sections were viewed using a

## **Partie II : Résultats et Discussion - Phosphatase Inactive Myotubularin Rescues X-linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice**

a fluorescence microscope (DM4000; Leica Microsystems, Sunnyvale, CA).

### **Transmission electron microscopy**

Muscle biopsies from TA muscles of anesthetized mice were fixed with 4% PFA and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) and processed as described [30]. Determination of the triads organization was accomplished on images at the magnification of x 25,000. The triad structure was identified using morphological criteria on the longitudinal sections of the muscle and the number of triads per sarcomere was quantified. Ratio of triads/sarcomere was calculated by dividing number of triad structure identified by the total number of sarcomere present on the section.

### **Microsome Preparations**

Frozen muscles were homogenized to prepare membranous (microsomal) fractions from skeletal muscles [32]. Membrane fractionation was confirmed using several protein markers: mouse anti-SERCA1 (MA3-911; ABR) and mouse anti- $\alpha$ -sarcoglycan [46], cytoplasmic protein mouse anti- $\beta$ -tubulin (IGBMC antibody facility) and nucleus protein mouse anti-TATA-box-binding protein (IGBMC antibody facility).

### **Desmin solubility assays**

Cells or muscles were treated as described in [32] with the following modifications. Extracts were obtained by homogenization in extraction buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 1mM DTT, 0,5% Triton X-100, 2mM PMSF) supplemented with complete protease inhibitor tablet (Roche), 1mM Leupeptin and 1mM pepstatin A (SIGMA). Equal weight of tibialis anterior muscles were homogenized with a Polytron® homogenizer (Kinematica Inc.) in ice-cold extraction buffer supplemented with 0.05% (w/v) SDS. The muscle

extracts were incubated ON at 4°C in the extraction buffer with 0.1% of N-Lauroylsarcosine Sodium Salt solution (SIGMA). Muscle extracts were centrifuged during 30 min at 30,000 rpm at 4°C. Pellets were collected as the insoluble material and solubilized in extraction buffer supplemented with 8M Urea.

### **Acknowledgements**

We would like to thank Scott Emr for sharing strains, members of S.F. laboratory for critical reading of the manuscript and Jean-Louis Mandel for discussions, Galina Kaneva and Jean-Marie Garnier (IGBMC Genetic Engineering platform) for cloning and Galina Kaneva for performing preliminary experiments. This work was supported by grants from INSERM, Collège de France (to J.L. and fellowship to B.S.C.), CNRS (ATIP-05-00932 and ATIP-Plus-08-3098 to S.F.), Université de Strasbourg (UdS), the Association Française contre les Myopathies (AFM grant to J.L. and fellowship to D.B.), Fondation Recherche Médicale (FRM DEQ20071210538 to J.L., INE20051105238 and FRM-Comité Alsace 2006CX67-1 to S.F.), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC JR/MLD/MDV-CR306/7901 to S.F.), Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-BLAN-0065 to J.L., B.P., H.T., G.C. and S.F.), the E-rare program to J.L., G.C., B.P. and H.T. and a BDI-CNRS Région Alsace fellowship to L.A.

### **Supplementary materials and methods**

#### **Plasmids, Yeast Strains and media**

The human *MTM1* ORF was cloned into the BamHI and EcoRV sites of pENTR™1A plasmid (Invitrogen) to generate an entry clone bearing *MTM1* ORF flanked by attL1 and attL2 sites. The different *MTM1* mutants were created by mutagenesis on the pENTR1A-MTM1 vector using the QuikChange® site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Gateway system LR reactions (Invitrogen) were performed to

## **Partie II : Résultats et Discussion - Phosphatase Inactive Myotubularin Rescues X-linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice**

clone the different *MTM1* constructs into the yeast destination expression vectors pVV200 and pVV204 (obtained from the European Saccharomyces cerevisiae Archive for Functional Analysis EUROSCARF) (Van Mullem et al., 2003) or into a pAAV-MCS vector. All constructs were verified by sequencing. pXR1 (AAV1 serotype) plasmid was a kind gift from Jude Samulski at the Gene Therapy Center, The University of North Carolina at Chapel Hill, USA. The AAV Helper-Free system was purchased from Stratagene (La Jolla, CA, Catalog number 240071).

*S. cerevisiae* WT SEY6210 (*MAT $\alpha$  ura3-52, leu2-3, 112, his3- $\Delta$ 200, trp1- $\Delta$ 901, his2-801, suc2- $\Delta$ 9*) and *ymr1 $\Delta$*  (*MAT $\alpha$  ura3-52, leu2-3, 112, his3- $\Delta$ 200, trp1- $\Delta$ 901, his2-801, suc2- $\Delta$ 9 ymr1::HIS3*) strains were a kind gift from Scott Emr [4]. Yeast cells were transformed using lithium acetate (Gietz et al., 1992). Transformants bearing the pVV200 and pVV204 derived plasmids were selected on SC-Trp medium.

### **Western Blot analysis and subcellular fractionation**

Muscles were homogenized in 50 mM Tris, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 10 mM beta-glycerophosphate, 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.1% SDS, 2% Triton X-100 and protease inhibitors (PIC, Roche Diagnostics) using a Polytron® homogenizer (Kinematica Inc.), kept on ice for 10 min, and centrifuged at 2,000 rpm (5417R, Eppendorf) for 5 min to collect the supernatant and proteins were quantified with the Biorad Protein Assay detection kit. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and revealed by ECL chemiluminescence after incubation with primary then HRP-coupled secondary antibodies. Mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was from Chemicon (Temecula, CA; GAPDH, MAB374). Rabbit anti-MTM1 antibody (R2868) was made at the IGBMC polyclonal antibody facility against the murine sequence TSSSSQMVPHVQTHF. Secondary antibodies against

mouse and rabbit IgG, conjugated with horseradish peroxidase (HRP) were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). ECL chemiluminescent reaction kit was purchased from Pierce.

Yeast *ymr1 $\Delta$*  transformed cells were grown in SC-Trp medium until OD<sub>600nm</sub>=0.5-0.8. Cells were harvested by a 1,600xg centrifugation for 5 min at 4°C and washed once in PBS1X, sorbitol 0.3 M. Pellets were resuspended in 1 mL lysis buffer (PBS1X, sorbitol 0.3 M, Complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail™ (Roche Diagnostics), PMSF 1 mM and after addition of 1 mL of 0.45 mm glass beads, cells were broken at 4°C using a FASTprep® (MP Biomedicals) with 5 runs of 30 sec under strong agitation (6.5 M/S) and cooled on ice for 1 min between each run. Lysates were cleared by a 5 min centrifugation at 800xg, supernatants representing total yeast protein extracts were collected, and protein concentrations were determined by using the Biorad Protein Assay detection kit.

Yeast subcellular fractionation was performed by differential centrifugation on the total protein extracts as previously described [6]. The lysate was centrifuged at 13,000xg for 10 min at 4°C. The pellet (P13) was kept for analysis and the supernatant was subjected to centrifugation at 100,000xg for 1h at 4°C. The resulting pellet (P100) and supernatant (S100) were collected and S100 represents the cytoplasmic fraction. All pellets (P13 and P100) representing the membrane fractions were resuspended in 200  $\mu$ l of cytosol buffer (20mM Hepes pH6.8, 0.15M KoAc, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25M Sorbitol). All fractions were analyzed by SDS-PAGE and Western blot using ECL protocols (GE Healthcare). Mouse monoclonal 1G6 anti-MTM1 (1/10,000) (Laporte et al., 2001), mouse monoclonal anti-PGK1 (1/400) (Invitrogen), anti-Vps10 (1/200) (Invitrogen) and HRP-coupled anti-mouse Ig (1/10,000) (GE Healthcare) antibodies were used.

#### **FM4-64 staining and vacuolar morphologies quantification**

N-[3-triethylammoniumpropyl]-4-[p-diethylaminophenylhexatrienyl] pyridinium dibromide (FM4-64, Invitrogen) staining was performed by incubating YPD resuspended yeast cells with 16  $\mu\text{M}$  of FM4-64 for 15 min at 25°C (Vida and Emr, 1995). Labeled yeast cells were then harvested and resuspended in 1 mL fresh selective medium for a 1h chase at 25°C, then washed once in selective medium. Cells were then observed in the selective medium using fluorescence microscopy (Axiovert200, Zeiss, 100X objective, DIC and TRITC filters). Images were acquired with the Axiovision (Zeiss) software using the CoolSnapHQ2 camera (Roper Scientific) and processed with the ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011). For each strain, at least 300 cells were counted and classified into one of the three categories: unilobar large or giant, small one or two lobes and more than two lobes or fragmented vacuoles. The small or large unilobar vacuoles classes correspond respectively to a unique vacuole filling either less than 50% of the cell volume (in grey), or more than 50% of the cell volume (in white).

#### **Immunoprecipitation**

For one immunoprecipitation assay, 30  $\mu\text{L}$  protein A-Sepharose, 30  $\mu\text{L}$  protein G-Sepharose and 30  $\mu\text{L}$   $\gamma$ -bind-Sepharose beads (GE Healthcare) were mixed, before to be washed twice in prechilled PBS1X and coated under gentle agitation on a wheel at 4°C for 90 min with 500  $\mu\text{L}$  of PBS 1X, BSA 2%, NP40 0.5% buffer and 5  $\mu\text{L}$  of mouse monoclonal anti-MTM1 1G6 antibodies. 5 mg of total yeast protein extract was incubated with the beads mix for 15 h at 4°C on a wheel. Beads were then washed 5 times in cold PBS1X + proteases inhibitors. The beads pellets were resuspended in 20  $\mu\text{L}$  MTM1 phosphatase reaction

buffer (Ammonium acetate 1 M + dithiothreitol pH6 0,2 mM) (Taylor and Dixon, 2001).

#### **In vitro phosphoinositide phosphatase assay**

Phosphatase reaction assays were performed using 0.6  $\mu\text{g}$  fluorescent phosphoinositide (BODIPY®-FL PPI<sub>n</sub>, C6, Echelon) and 10 to 20  $\mu\text{L}$  Sepharose beads [2]. Phosphatase assays were incubated for 30 min at 37°C in 45  $\mu\text{L}$  of MTM1 phosphatase reaction buffer. Reactions were terminated by addition of 100  $\mu\text{l}$  of cold acetone and then evaporated in a Speed-Vac evaporator set on low heat [1,2]. The dried phosphatase assay products were resuspended in 6  $\mu\text{l}$  of methanol and spotted onto a pretreated (methanol/water (3/2) + potassium oxalate 1%) glass-backed TLC plate (Merck TLC Silica Gel60 F254 20x20cm) and were allowed to migrate. The TLC plate was developed in a solvent system consisting of dichloromethane, MeOH, water, concentrated ammonium hydroxide (Roth, Rotipuran® Supra, 20%) (90/70/17/3) and then air-dried. Fluorescent lipids were visualized by UV light using a transilluminator (Appligen, Oncor).

#### **Yeast phosphoinositide measurements by metabolic labeling**

Labeling and lipid extraction procedures were done as previously described (Hama et al., 2000). *ymr1* $\Delta$  yeast cells producing the different forms of MTM1 were grown in 5 mL of selective medium containing 40  $\mu\text{Ci/ml}$   $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  (NEX054, Perkin Elmer) during 16h at 30°C. At OD<sub>600nm</sub> 0.8-1 cells were lysed by the addition of TCA at a final concentration of 5% and incubated 1h on ice. After a 10,000xg centrifugation for 3 min at 4°C, pellets were washed once in chilled water and resuspended in 200 $\mu\text{L}$  water. 300 $\mu\text{L}$  of EEP extraction solution (95% EtOH :diethyl ether :pyridine at 15 :5 :1 v/v) was added. Lipids were extracted at 57°C for 30 minutes under shaking. Undissolved materials were pelleted by a 5 minutes centrifugation at 10,000xg and supernatants were collected in glass

tubes for evaporation under argon flow. Dried lipids were dissolved in 100  $\mu$ L chloroform/methanol (10:10) and evaporated under argon until 10-20  $\mu$ L remained in the tubes. Samples were spotted on oxalate pre-treated TLC plates (MERCK TLC Silica Gel60 F<sub>254</sub> 20x20cm). Migration was performed with chloroform/methanol/NH<sub>4</sub>OH 10% (9:7:2 v/v) in a hermetic chamber until the solvent migration front reached 2 cm from the top. Labeled spots were identified by autoradiography and PPI standards. Labeled PtdIns $P$  as well as PtdIns $P_2$  were scraped off the plates, collected and deacylated before being analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) Whatman PartiSphere 5 SAX (4.6 x 125 mm) as previously described (Payrastré, 2004).

#### **PtdIns5P mass assay in yeast**

*Ymr1 $\Delta$*  yeast cells producing the different forms of MTM1 were grown to exponential phase in selective medium and 178.75 OD units were harvested at OD<sub>600nm</sub>  $\approx$  0.8. Cells lysis as well as lipids extraction and TLC separation were performed as described for the metabolic labeling. The spots corresponding to PtdIns $P$  were extracted and submitted to an *in vitro* kinase assay using recombinant PtdIns5P 4-kinase type II $\alpha$  in presence of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP [2,11]. Among the different PtdIns $P$  species, this kinase specifically phosphorylates PtdIns5P to PtdIns(4,5) $P_2$ . After the *in vitro* kinase reaction, lipids were separated by TLC and the spot corresponding to PtdIns(4,5) $P_2$  was scrapped off and radioactivity was measured by a scintillation counter. The measured quantity of <sup>32</sup>P-PtdIns(4,5) $P_2$  will directly represent the *in vivo* PtdIns5P intracellular levels. The mass amount of PtdIns5P (pmol) was determined by comparison of the incorporated radioactivity in our samples with a calibration curve obtained by using di-C16-PtdIns5P.

#### **Production and purification of Adeno-Associated Virus (rAAV)**

rAAV2/1 vectors were generated by a triple transfection of AAV-293 cell line with pAAV2-insert containing the insert under the control of the CMV promoter and flanked by serotype-2 inverted terminal repeats, pXR1 containing rep and cap genes of AAV serotype-1, and pHelper encoding the adenovirus helper functions. Cell lysates were subjected to 3 rounds of freeze/thaw, then treated with 50U/mL Benzonase (Sigma) for 30 minutes at 37°C and clarified by centrifugation. Viral vectors were purified by Iodixanol gradient ultracentrifugation followed by dialysis and concentration against DPBS using centrifugal filters (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 30K). Physical particles were quantified by real time PCR using a plasmid standard pAAV-eGFP and titers are expressed as viral genomes per ml (vg/ml). rAAV titers used in these experiments were 5-7.10<sup>11</sup> vg/ml.

#### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using the unpaired student's *t* test unless stated otherwise. p-values of <0.05 were considered significant.

## References

1. Laporte J, Hu LJ, Kretz C, Mandel JL, Kioschis P, et al. (1996) A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet* 13: 175-182.
2. Jungbluth H, Wallgren-Pettersson C, Laporte J (2008) Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis* 3: 26.
3. Biancalana V, Caron O, Gallati S, Baas F, Kress W, et al. (2003) Characterisation of mutations in 77 patients with X-linked myotubular myopathy, including a family with a very mild phenotype. *Hum Genet* 112: 135-142.
4. Buj-Bello A, Laugel V, Messaddeq N, Zahreddine H, Laporte J, et al. (2002) The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15060-15065.
5. Laporte J, Biancalana V, Tanner SM, Kress W, Schneider V, et al. (2000) MTM1 mutations in X-linked myotubular myopathy. *Hum Mutat* 15: 393-409.
6. Herman GE, Kopacz K, Zhao W, Mills PL, Metzenberg A, et al. (2002) Characterization of mutations in fifty North American patients with X-linked myotubular myopathy. *Hum Mutat* 19: 114-121.
7. Tsai TC, Horinouchi H, Noguchi S, Minami N, Murayama K, et al. (2005) Characterization of MTM1 mutations in 31 Japanese families with myotubular myopathy, including a patient carrying 240 kb deletion in Xq28 without male hypogonadism. *Neuromuscul Disord* 15: 245-252.
8. Laporte J, Kress W, Mandel JL (2001) Diagnosis of X-linked myotubular myopathy by detection of myotubularin. *Ann Neurol* 50: 42-46.
9. Tosch V, Vasli N, Kretz C, Nicot AS, Gasnier C, et al. (2010) Novel molecular diagnostic approaches for X-linked centronuclear (myotubular) myopathy reveal intronic mutations. *Neuromuscul Disord* 20: 375-381.
10. Caldwell KK, Lips DL, Bansal VS, Majerus PW (1991) Isolation and characterization of two 3-phosphatases that hydrolyze both phosphatidylinositol 3-phosphate and inositol 1,3-bisphosphate. *J Biol Chem* 266: 18378-18386.
11. Nandurkar HH, Layton M, Laporte J, Selan C, Corcoran L, et al. (2003) Identification of myotubularin as the lipid phosphatase catalytic subunit associated with the 3-phosphatase adapter protein, 3-PAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8660-8665.
12. Taylor GS, Maehama T, Dixon JE (2000) Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8910-8915.
13. Blondeau F, Laporte J, Bodin S, Superti-Furga G, Payrastré B, et al. (2000) Myotubularin, a phosphatase deficient in myotubular myopathy, acts on phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 3-phosphate pathway. *Hum Mol Genet* 9: 2223-2229.
14. Schaletzky J, Dove SK, Short B, Lorenzo O, Clague MJ, et al. (2003) Phosphatidylinositol-5-phosphate activation and conserved substrate specificity of the myotubularin phosphatidylinositol 3-phosphatases. *Curr Biol* 13: 504-509.
15. Backer JM (2008) The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* 410: 1-17.
16. Lecompte O, Poch O, Laporte J (2008) PtdIns5P regulation through evolution: roles in membrane trafficking? *Trends Biochem Sci*.
17. Velichkova M, Juan J, Kadandale P, Jean S, Ribeiro I, et al. (2010) Drosophila Mtm and class II PI3K coregulate a PI(3)P pool with cortical and endolysosomal functions. *J Cell Biol* 190: 407-425.
18. Dove SK, Dong K, Kobayashi T, Williams FK, Michell RH (2009) Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate and Fab1p/PIKfyve underpin endo-lysosome function. *Biochem J* 419: 1-13.
19. Laporte J, Bedez F, Bolino A, Mandel JL (2003) Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositide phosphatases. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2: R285-292.
20. Robinson FL, Dixon JE (2006) Myotubularin phosphatases: policing 3-phosphoinositides. *Trends Cell Biol* 16: 403-412.
21. Parrish WR, Stefan CJ, Emr SD (2004) Essential role for the myotubularin-related phosphatase Ymr1p and the synaptojanin-like phosphatases Sjl2p and Sjl3p in regulation of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast. *Mol Biol Cell* 15: 3567-3579.
22. Cox K, Gattas M, Harvey P, Dolphin C, Friend K, et al. (2005) X-linked myotubular myopathy: mutation R69C identified in a family with multiple neonatal deaths. *Clin Genet* 67: 441-442.
23. Laporte J, Liaubet L, Blondeau F, Tronchère H, Mandel JL, et al. (2002) Functional redundancy in the myotubularin family. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 305-312.
24. Walker DM, Urbe S, Dove SK, Tenza D, Raposo G, et al. (2001) Characterization of MTMR3, an inositol lipid 3-phosphatase with novel substrate specificity. *Curr Biol* 11: 1600-1605.
25. Gary JD, Wurmser AE, Bonangelino CJ, Weisman LS, Emr SD (1998) Fab1p is essential for PtdIns(3)P 5-kinase activity and the maintenance of vacuolar size and membrane homeostasis. *J Cell Biol* 143: 65-79.
26. Dove SK, Cooke FT, Douglas MR, Sayers LG, Parker PJ, et al. (1997) Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* 390: 187-192.

27. Bonangelino CJ, Nau JJ, Duex JE, Brinkman M, Wurmser AE, et al. (2002) Osmotic stress-induced increase of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate requires Vac14p, an activator of the lipid kinase Fab1p. *J Cell Biol* 156: 1015-1028.
28. Tronchere H, Laporte J, Pendaries C, Chaussade C, Liaubet L, et al. (2004) Production of phosphatidylinositol 5-phosphate by the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin in mammalian cells. *J Biol Chem* 279: 7304-7312.
29. Morris JB, Hinchliffe KA, Ciruela A, Letcher AJ, Irvine RF (2000) Thrombin stimulation of platelets causes an increase in phosphatidylinositol 5-phosphate revealed by mass assay. *FEBS Lett* 475: 57-60.
30. Al-Qusairi L, Weiss N, Toussaint A, Berbey C, Messaddeq N, et al. (2009) T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18763-18768.
31. Buj-Bello A, Fougereousse F, Schwab Y, Messaddeq N, Spehner D, 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. *Hum Mol Genet* 17: 2132-2143.
32. Hnia K, Tronchere H, Tomczak KK, Amoasii L, Schultz P, et al. (2011) Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *J Clin Invest* 121: 70-85.
33. Dowling JJ, Vreede AP, Low SE, Gibbs EM, Kuwada JY, et al. (2009) Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet* 5: e1000372.
34. Laporte J, Guiraud-Chaumeil C, Vincent MC, Mandel JL, Tanner SM, et al. (1997) Mutations in the MTM1 gene implicated in X-linked myotubular myopathy. ENMC International Consortium on Myotubular Myopathy. European Neuro-Muscular Center. *Hum Mol Genet* 6: 1505-1511.
35. Begley MJ, Taylor GS, Brock MA, Ghosh P, Woods VL, et al. (2006) Molecular basis for substrate recognition by MTMR2, a myotubularin family phosphoinositide phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 927-932.
36. Ribeiro I, Yuan L, Tanentzapf G, Dowling JJ, Kiger A (2011) Phosphoinositide regulation of integrin trafficking required for muscle attachment and maintenance. *PLoS Genet* 7: e1001295.
37. Pierson CR, Dulin-Smith AN, Durban AN, Marshall ML, Marshall JT, 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. *Hum Mol Genet* 21: 811-825.
38. Laporte J, Blondeau F, Gansmuller A, Lutz Y, Vonesch JL, et al. (2002) The PtdIns3P phosphatase myotubularin is a cytoplasmic protein that also localizes to Rac1-inducible plasma membrane ruffles. *J Cell Sci* 115: 3105-3117.
39. Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, et al. (2004) PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118: 375-387.
40. Vanhaesebroeck B, Rohn JL, Waterfield MD (2004) Gene targeting: attention to detail. *Cell* 118: 274-276.
41. Varnai P, Balla T (2007) Visualization and manipulation of phosphoinositide dynamics in live cells using engineered protein domains. *Pflugers Arch* 455: 69-82.
42. Vida TA, Emr SD (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* 128: 779-792.
43. Hama H, Takemoto JY, DeWald DB (2000) Analysis of phosphoinositides in protein trafficking. *Methods* 20: 465-473.
44. Payrastre B (2004) Phosphoinositides: lipid kinases and phosphatases. *Methods Mol Biol* 273: 201-212.
45. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
46. Rivier F, Robert A, Royuela M, Hugon G, Bonet-Kerrache A, et al. (1999) Utrophin and dystrophin-associated glycoproteins in normal and dystrophin deficient cardiac muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 20: 305-314.

### Supplementary References

1. Taylor GS, Dixon JE (2001) An assay for phosphoinositide phosphatases utilizing fluorescent substrates. *Anal Biochem* 295: 122-126.
2. Tronchere H, Laporte J, Pendaries C, Chaussade C, Liaubet L, et al. (2004) Production of phosphatidylinositol 5-phosphate by the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin in mammalian cells. *J Biol Chem* 279: 7304-7312.
3. Van Mullem V, Wery M, De Bolle X, Vandenhoute J (2003) Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast* 20: 739-746.
4. Parrish WR, Stefan CJ, Emr SD (2004) Essential role for the myotubularin-related phosphatase Ymr1p and the synaptojanin-like phosphatases Sjl2p and Sjl3p in regulation of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast. *Mol Biol Cell* 15: 3567-3579.
5. Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20: 1425.
6. Bonangelino CJ, Catlett NL, Weisman LS (1997) Vac7p, a novel vacuolar protein, is required for normal vacuole inheritance and morphology. *Mol Cell Biol* 17: 6847-6858.



7. Laporte J, Kress W, Mandel JL (2001) Diagnosis of X-linked myotubular myopathy by detection of myotubularin. *Ann Neurol* 50: 42-46.
8. Vida TA, Emr SD (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* 128: 779-792.
9. Hama H, Takemoto JY, DeWald DB (2000) Analysis of phosphoinositides in protein trafficking. *Methods* 20: 465-473.
10. Payrastre B (2004) Phosphoinositides: lipid kinases and phosphatases. *Methods Mol Biol* 273: 201-212.
11. Morris JB, Hinchliffe KA, Ciruela A, Letcher AJ, Irvine RF (2000) Thrombin stimulation of platelets causes an increase in phosphatidylinositol 5-phosphate revealed by mass assay. *FEBS Lett* 475: 57-60.

### **C. Les niveaux de MTM1s sont régulés dans *S. cerevisiae***

Lors de l'expression hétérologue de MTM1 dans *S. cerevisiae*, nous avons pu observer des différences dans les niveaux de MTM1 détectés en Western Blot (cf. article). En effet, de manière hautement reproductible, les niveaux de MTM1<sup>C375S</sup> et de MTM1<sup>R421Q</sup> sont plus élevés que ceux de MTM1<sup>WT</sup>, MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup> et MTM1<sup>N180K</sup>. Cette tendance corrèle avec l'activité phosphatase des différents mutants puisque plus une myotubularine est active dans *S. cerevisiae*, moins elle est détectée en Western Blot.

Notre méthode pour mesurer la concentration de nos cultures est basée sur la turbidimétrie. En d'autre terme, nous mesurons l'absorbance des cellules en suspension à une longueur d'onde de 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Néanmoins la surexpression d'une myotubularine active induit une augmentation du volume vacuolaire mais également une légère augmentation de la taille des cellules. Par conséquent, il est possible qu'à densité optique (DO<sub>600nm</sub>) égale, les cultures contenant des cellules plus volumineuses, exprimant par exemple une myotubularine active, soient en réalité moins denses que les cultures contenant des cellules de plus petites tailles. Dans cette hypothèse, les différences de niveaux de MTM1 détectés seraient donc dues à une différence de quantité de protéines déposées sur gel. Cette hypothèse semble peu probable car dans ce cas le niveau de la phosphoglycérate kinase (Pgc1) une enzyme clef de la glycolyse également analysé sur le même blot devrait suivre celui de MTM1 ce qui n'est pas le cas (Figure 1 de l'article). Cependant afin d'exclure totalement cette possibilité, les concentrations des différentes cultures ont été évaluées à l'aide d'une cellule de numération de type Neubauer. Puis un nombre identique de cellules ont été lysées et analysées par Western Blot. Les résultats (non montrés ici) confirment que les niveaux des différents mutants MTM1 dépendent de leur activité phosphatase puisque les mêmes différences entre les niveaux de myotubularines actives et ceux de myotubularines inactives ont été mises en évidence à quantité égale de cellules. Par ailleurs, ces différences très nettes alors que les niveaux de Pgc1 (Phosphoglycérate kinase 1) demeurent constants sont un argument

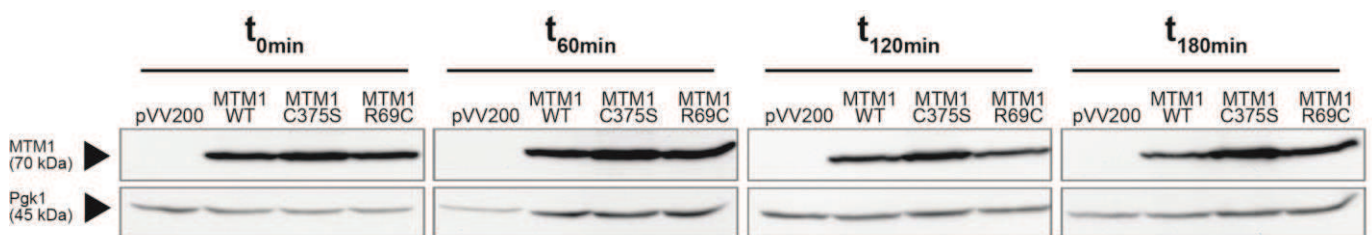
supplémentaire en faveur d'une régulation des niveaux de myotubularines dans *S. cerevisiae* dépendante de leurs activités phosphatase.

Il est par ailleurs très peu probable que ces différences soient dues à des différences dans les niveaux de transcription puisque ces observations ont été faites en présence de deux plasmides différents portant les cDNA des différents mutants MTM1 sont le contrôle de deux promoteurs différents : le promoteur fort de levure PGK (plasmide pVV200) et le promoteur bactérien TetO régulable à la tétracycline (pVV204). De plus, ces observations ont été faites dans les cellules mutantes *ymr1Δ* et dans la souche sauvage de levure, ils ne dépendent donc pas d'une possible hétéro-dimérisation entre Ymr1 et MTM1.

### 1. Les MTM1s sont stables dans *S. cerevisiae*

En fait, des niveaux différents de MTM1 peuvent s'expliquer de plusieurs manières. D'une part, il peut s'agir d'une différence dans les niveaux de production des protéines ou d'autre part, dans les niveaux de stabilité et de dégradation des protéines. J'ai entrepris d'examiner la stabilité de trois myotubularines présentant les plus grandes différences de niveaux de protéines : MTM1<sup>WT</sup>, MTM1<sup>C375S</sup> et MTM1<sup>R69C</sup>. Pour cela, j'ai analysé les niveaux de MTM1 au cours du temps après ajout dans les cultures de cycloheximide à une concentration de 100μg/mL. Le cycloheximide est un inhibiteur de la biosynthèse protéique dans les cellules eucaryotes. Ainsi, en absence de néosynthèse de protéines MTM1, il est possible d'observer la stabilité au cours du temps des protéines synthétisées avant l'ajout de cycloheximide. Le mode d'action du cycloheximide n'est que partiellement compris mais il serait impliqué dans un blocage de la traduction (Schneider-Poetsch et al., 2010).

Les résultats ne montrent pas de différences notables dans la stabilité des mutants MTM1<sup>R69C</sup> et MTM1<sup>C375S</sup> par rapport à MTM1<sup>WT</sup> 3h après l'addition de cycloheximide. Les trois myotubularines sont toujours détectables 3h après le blocage de la biosynthèse protéique en quantités quasi-équivalentes aux quantités initiales (Figure 42).

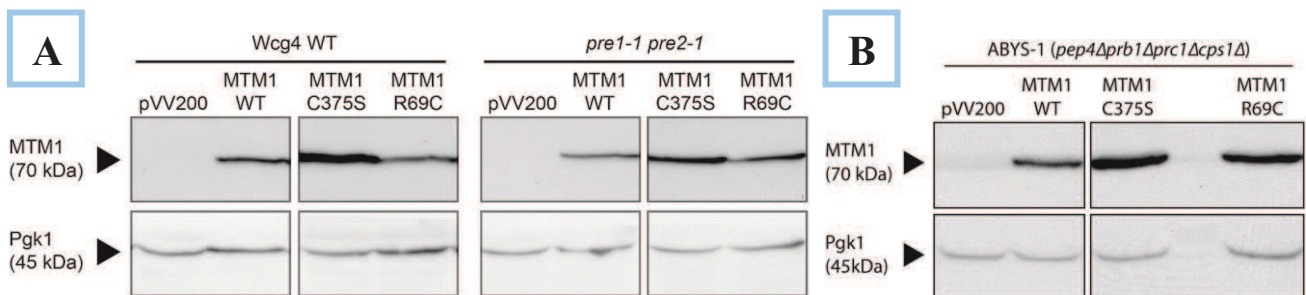


**Figure 42 : Stabilité des myotubularines après blocage de la néosynthèse protéique par le cycloheximide. MTM1 a été détectée par western blot avec un anticorps anti-MTM1 monoclonal de souris.**

## 2. Les MTM1s actives ne sont pas préférentiellement dégradées par rapport aux inactives dans *S. cerevisiae*

En absence de néosynthèse de MTM1, les différents mutants MTM1 sont remarquablement stables dans *S. cerevisiae*. Si la stabilité n'explique pas les différences de niveaux de MTM1, il est possible que les différents mutants MTM1 soient dégradés selon leur activité phosphatase afin d'éviter une possible cytotoxicité. J'ai par conséquent analysé les niveaux de ces trois mutants MTM1 dans des mutants soit du protéasome, soit de protéases vacuolaires. Les levures *pre1-1 pre2-1* sont mutées dans les sous-unités  $\beta 4$  et  $\beta 5$  du protéasome 20S respectivement et sont déféctueuses dans la dégradation dépendante du protéasome. Les mutants *pep4 $\Delta$ prb1 $\Delta$ prc1 $\Delta$ cps1 $\Delta$*  sont mutés pour les quatre protéases vacuolaires principales : la protéinase A, la protéinase B, la carboxypeptidase Y (CPY) et la carboxypeptidase S (CPS) respectivement, responsables de la dégradation des protéines dans le lumen de la vacuole (Achstetter et al., 1984).

Dans ces deux souches mutantes, les mêmes différences de niveaux de MTM1 détectées ont été observées. Les processus de dégradation faisant intervenir le protéasome ou les protéases vacuolaires n'expliquent donc pas les variations de niveaux de MTM1 détectées par WB.



**Figure 43 : Niveaux de MTM1 détectés par WB dans des mutants A) du protéasome ou B) des quatre protéases vacuolaires principales.** MTM1 a été détectée par western blot avec un anticorps anti-MTM1 monoclonal de souris.

## **DISCUSSION**

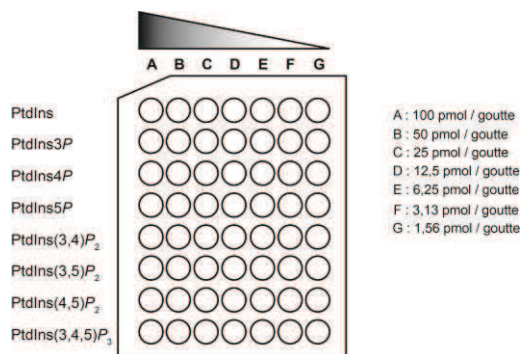
Il est très intéressant de constater que la levure *S. cerevisiae* est capable de réguler les quantités de myotubularines humaines. L'expression hétérologue de différents mutants MTM1 révèle une régulation en rapport avec l'activité phosphatase des différentes myotubularines. Je n'ai pu observer aucune différence de stabilité entre les protéines mutantes testées. De plus, cette régulation n'implique pas les processus de dégradation ni via le protéasome ni par le biais d'une protéolyse vacuolaire. Une régulation de la transcription est peu plausible puisque les mêmes différences ont été observées en utilisant deux vecteurs différents portant les cDNA sous le contrôle de deux promoteurs distincts. Il est donc possible que cette régulation intervienne à l'étape de traduction de l'ARNm mature (après épissage). Je n'ai malheureusement pas pu mettre en évidence les mécanismes de cette régulation chez *S. cerevisiae*.

Par ailleurs, cette régulation n'intervient probablement pas non plus en réponse à une perception des niveaux de PtdIns3P intracellulaires puisqu'il a été montré que les souches ayant des hydrolases vacuolaires défectueuses accumulent 4 à 5 fois plus de PtdIns3P que les souches sauvages en raison d'un défaut de recyclage de PPI<sub>n</sub> (Wurmser and Emr, 1998). Or malgré cette augmentation en PtdIns3P, les mêmes différences ont été observées dans le mutant des protéases vacuolaires (Figure 43).

### **D. Propriétés de liaison aux substrats de MTM1s recombinantes**

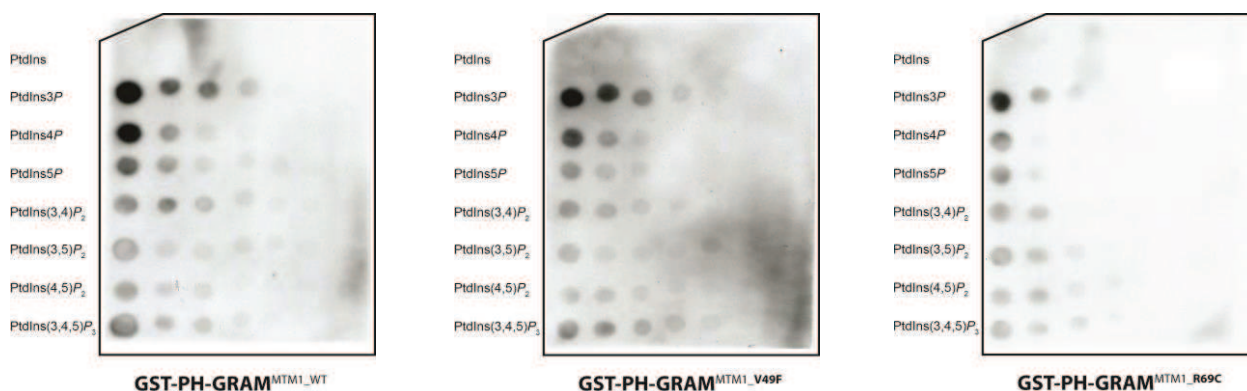
Au laboratoire, nous avons analysé la capacité de la myotubularine MTM1 à lier ses substrats. En vue de cette analyse, les protéines MTM1<sup>WT</sup>, MTM1<sup>C375S</sup>, MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> ou uniquement les domaines PH-GRAM WT, V49F et R69C (acides aminés 8-112) fusionnées à leurs extrémités N-terminales à l'étiquette GST ont été produites et purifiées à partir de bactéries *E. coli* Rosetta<sup>TM</sup> (BL21 pLysSRARE) transformées par les plasmides pSF10 à 13 (protéines complètes) ou pJL3 à 5 (domaine PH-GRAM seul). Le plasmide pLysSRARE porte sept gènes codant pour des ARNt et décodant des codons rarement utilisés par *E. coli* mais plus communs chez les eucaryotes. Ce plasmide permet une meilleure production de protéines eucaryotes dans la bactérie. Les protéines de fusion GST ont été purifiées par chromatographie d'affinité à l'aide de bille Glutathione-sepharose et éluées à l'aide de Glutathione réduite.

La capacité des différentes formes de MTM1 à reconnaître les PPIIn est analysée à l'aide de membranes sur lesquelles sont fixés différents phosphoinositides en gouttes séparées, d'après la technique du « dot blot ». Ces membranes, appelées PIP array<sup>TM</sup>, présentent les différents phosphoinositides en gamme de concentration (Figure 44). Après blocage dans du TBS-Tween 0,1%+ 3%BSA « fatty acid free », les membranes sont incubées une nuit à 4°C avec les extraits de protéines purifiées à une concentration de 1µg/mL. Puis les membranes sont lavées de la même manière qu'une membrane de Western blot avant de réaliser l'immunodétection anti-GST des protéines GST-MTM1 ou des domaines GST-PH-GRAM sauvages et mutants.



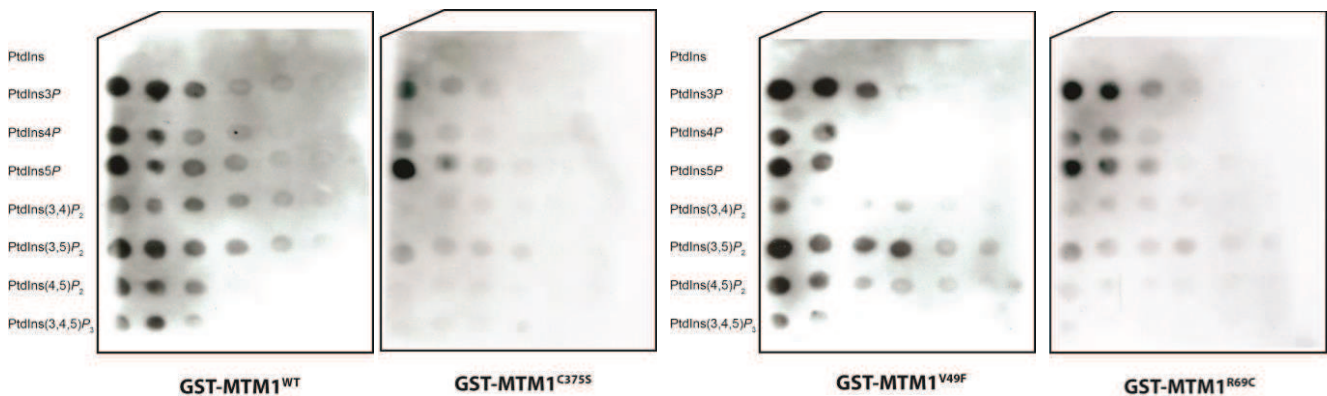
**Figure 44 : Représentation d'une membrane PIP array<sup>TM</sup> et les différents PPIIn en concentration décroissantes.**

Ces analyses par PIP array<sup>TM</sup> ont été réalisées au laboratoire par Katy FENDER lors de son stage de deuxième année de DUT Génie Biologique. Elle a ainsi pu montrer que le domaine PH-GRAM sauvage de MTM1 est capable de lier principalement le PtdIns3P et le PtdIns4P. Dans une moindre mesure, il fixe également le PtdIns5P et le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> **mais pas le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>**. Les domaines PH-GRAM<sup>V49F</sup> et PH-GRAM<sup>R69C</sup> conservent la capacité de lier le PtdIns3P mais semblent avoir moins d'affinité pour le PtdIns4P (Figure 45). En revanche ni l'un ni l'autre ne lie significativement le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>.



**Figure 45 : Analyse de l'affinité des domaines PH-GRAM de MTM1 sauvage ou des mutants V49F et R69C pour les différents PPIIn par PIP array<sup>TM</sup>.** Les protéines purifiées ont été incubées la nuit à 4°C sur les membranes et révélées par immunodétection.

Concernant les spécificités de liaison avec les PPIIn des protéines GST-MTM1 complètes, il apparaît que la protéine GST-MTM1<sup>WT</sup> est capable de lier certains PPIIn que le domaine PH-GRAM<sup>WT</sup> seul ne lie pas. En effet, GST-MTM1<sup>WT</sup> lie également le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, un des substrats de MTM1. De manière très surprenante, la myotubularine catalytiquement inactive MTM1<sup>C375S</sup> présente un profil complètement différent de celui de la protéine sauvage. En effet, MTM1<sup>C375S</sup> lie préférentiellement le PtdIns5P et son affinité pour le PtdIns3P est considérablement diminuée. De plus, MTM1<sup>C375S</sup> ne lie pas le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> de manière significative en comparaison à la protéine sauvage. En revanche, le profil de la protéine mutante MTM1<sup>V49F</sup> est très similaire à celui de la protéine sauvage malgré la mutation dans son domaine PH-GRAM. Enfin, le mutant MTM1<sup>R69C</sup> présente une affinité pour le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> nettement diminuée par rapport à la protéine sauvage (Figure 46).



**Figure 46 : Analyse de l'affinité de la protéine MTM1 sauvage ou des mutants V49F et R69C pour les différents PPIIn par PIP array<sup>TM</sup>.** Les différentes protéines recombinantes purifiées ont été incubées avec les membranes et révélées par immunodétection.

### DISCUSSION

Les résultats obtenus par Katy FENDER au laboratoire montrent que les affinités des protéines complètes à l'encontre des PPIIn sont différentes de celles des domaines PH-GRAM seuls. Par conséquent, le domaine PH-GRAM n'est probablement pas le seul domaine impliqué dans la spécificité de MTM1 mais pourrait agir de concert avec d'autres domaines de MTM1, comme le domaine catalytique ou le motif coiled-coil. Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité que la protéine tronquée représentée par son seul domaine PH-GRAM soit structurée/repliée d'une manière différente que lorsque la protéine entière, ce qui pourrait expliquer les différences d'affinité entre le domaine PH-GRAM seul et la protéine complète.

De manière surprenante, entre nos mains, le domaine PH-GRAM<sup>WT</sup> de MTM1 ne fixe le PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> qu'avec une très faible affinité (Figure 45). Or les analyses réalisées à partir du même plasmide par Tsujita et coll. montrent que le domaine PH-GRAM<sup>WT</sup> lie fortement et préférentiellement le PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> en test ELISA (Tsujita et al., 2004) et leur profil obtenu en PIP array est nettement différent de celui obtenu par notre équipe.

Un autre aspect intéressant de ces résultats est l'incapacité du mutant catalytique MTM1<sup>C375S</sup> et du mutant MTM1<sup>R69C</sup> à lier le PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub>. En effet, dans le premier cas, MTM1<sup>C375S</sup> est catalytiquement inactif et cette perte d'activité enzymatique semble être étroitement associée à son incapacité à lier ses substrats. Dans le second cas, le mutant MTM1<sup>R69C</sup> induit chez *S. cerevisiae* un élargissement vacuolaire très important, caractéristique des myotubularines enzymatiquement actives. Par ailleurs, nos expériences de dosage du PtdIns3*P* et du PtdIns5*P* intracellulaire de levures *ymr1Δ* produisant MTM1<sup>R69C</sup> démontrent que ce mutant est actif et qu'il déphosphoryle le PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> en PtdIns5*P* *in vivo* dans *S. cerevisiae* (Figure 4 de l'article). Ces deux données ne corrélient pas avec l'absence de liaison entre MTM1<sup>R69C</sup> et le PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> que nous avons pu observer dans nos analyses *in vitro*.

Néanmoins, alors que Tsujita et coll. montrent (par dot-blot et par des test d'interaction sur liposomes) que leur domaine PH-GRAM<sup>WT</sup> lie fortement le PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub>, leur domaine PH-GRAM<sup>V49F</sup> présente une très faible affinité pour ce PPIIn. Dans nos mains également, le domaine PH-GRAM<sup>V49F</sup> ne lie pas de manière claire le PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub>. Pourtant la protéine MTM1<sup>V49F</sup> complète fixe le PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> et cette observation est en accord à la fois avec l'élargissement vacuolaire observé chez la levure produisant le mutant MTM1<sup>V49F</sup> et les dosages des PPIIn intracellulaires suggérant que cette myotubularine est enzymatiquement active *in vivo*.

Une particularité qui a attiré mon attention dans notre analyse est la capacité des protéines MTM1 complètes de se lier au PtdIns5*P* qui n'est pas un substrat des myotubularines. Cette liaison au PtdIns5*P* est indépendante des différentes mutations analysées puisque MTM1<sup>WT</sup>, MTM1<sup>C375S</sup>, MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> fixent ce phosphoinositide. Si cette interaction est intrigante c'est principalement parce-qu'il a été proposé que le PtdIns5*P* aurait un effet allostérique activateur de l'activité phosphatase de MTM1. Le PtdIns5*P* serait donc impliqué dans une boucle de rétrocontrôle positive favorisant d'une part l'oligomérisation de MTM1 et stimulant d'autre part la déphosphorylation des substrats PtdIns3*P* et PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub>. En outre, il est possible que la protéine recombinante produite en bactérie ne soit pas repliée exactement de la même manière que dans des cellules eucaryotes en raison de l'absence de chaperonnes spécifiques. Un autre désavantage de la production en bactérie est liée au fait que les protéines GST-MTM1 soient produites avec un rendement très faible et que ces protéines soient associées à des chaperonnes bactériennes (groEL et DnaK).

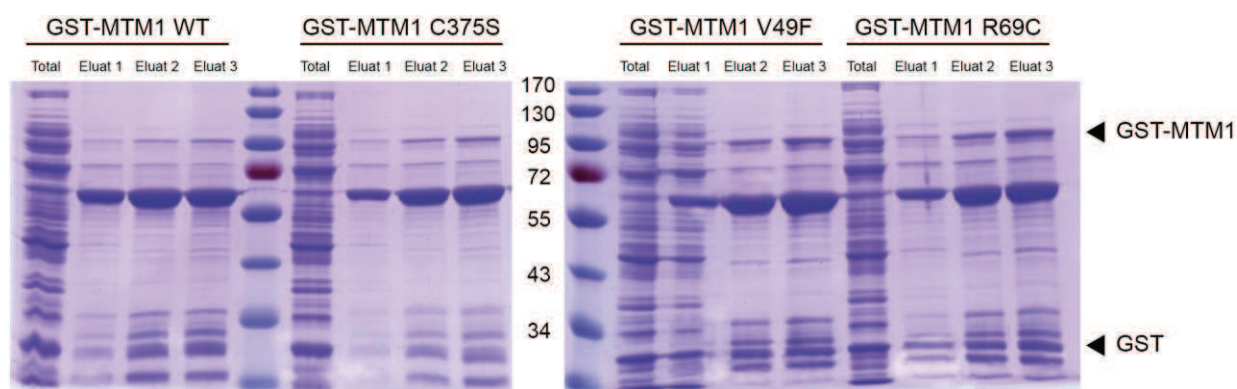
De plus, l'étiquette GST pourrait également influencer sur les liaisons avec les substrats, notamment pour des raisons d'encombrement stérique avec le domaine PH-GRAM. Ces deux derniers points seront discutés plus en détail dans la suite de mon travail.

Les différences entre nos résultats et ceux de Tsujita et al. peuvent donc laisser penser que le protocole expérimental tel que les bactéries utilisées, les conditions de culture et d'induction de la production de la protéine, les tampons utilisés, les temps d'incubations ou la température pourrait amener à des résultats différents. Mais surtout, la technique du test d'interaction protéine-PPIn par PIP-array a été beaucoup critiquée en particulier par Mark A. Lemmon en raison de son manque de reproductibilité pour des protéines ne liant pas les PPIn avec une très forte affinité, ce qui est sans aucun doute le cas pour MTM1 et son domaine PH-GRAM.

## E. Activité enzymatique de MTM1s recombinantes

### 1. Production et purification de GST-MTM1

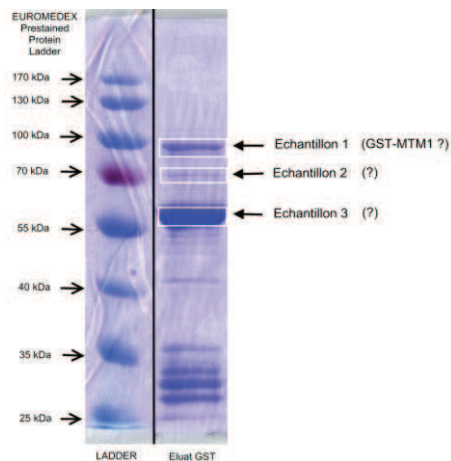
Afin d'analyser les activités enzymatiques *in vitro* des différents mutants MTM1, avant de purifier les MTM1 à partir de la levure (voir figure S4 de l'article), nous avons dans un premier temps utilisé la production en bactérie de protéines recombinantes, de la même manière que pour les expériences avec les membranes PIP Array™. Après purification par chromatographie d'affinité sur des billes de glutathione-sepharose, les éluats ont été analysés par SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de Coomassie du gel. La coloration révèle une bande à 97 kDa correspondant au poids moléculaires des GST-MTM1s et plusieurs bandes protéiques de poids moléculaires inférieurs 97 kDa (Figure 47). Ces mêmes bandes apparaissent pour tous les échantillons GST-MTM1 sauvage (WT) ou mutantes (C375S, V49F et R69C) avec une grande reproductibilité.



**Figure 47 : Coloration au bleu de Coomassie des extraits protéiques purifiés par GST-pulldown.** 10 µg de chaque échantillon sont séparés par SDS-PAGE 10%. La bande correspondant à GST-MTM1 est attendue aux alentours de 97 kDa. Plusieurs bandes contaminantes apparaissent (principalement à ± 60 kDa et 70 kDa) avec une grande reproductibilité.



Ces protéines ont donc été analysées par spectrométrie de masse (analyse MALDI-MS) après une extraction des bandes correspondantes du gel (Figure 48). Les analyses montrent que la bande à 97 kDa correspond bien à la protéine de fusion GST-MTM1. Les deux autres protéines ont été identifiées comme étant des chaperons (molecular chaperone DnaK et chaperonin GroEL, Figure



**Figure 48 : Isolement des bandes principales après purification de GST-MTM1.** Les protéines contaminantes ont été isolées par découpage du gel, référencées et remises à la plateforme protéomique de l'IBMC (Strasbourg).

49) endogènes à *E. coli* qui sont induits en présence de protéines mal réplées. Par ailleurs, nombre de protéines chaperonnes sont des protéines de choc thermique c'est-à-dire qu'elles sont exprimées en réponse à des variations de température, ou d'autres types de stress cellulaires. On peut alors supposer que l'induction de la synthèse de GST-MTM1 a généré un stress cellulaire induisant l'expression de ces protéines chaperons en grande quantité. Les concentrations des éluats mesurées par Bradford sont donc à pondérer avec le ratio MTM1/chaperons/GST libre, qui est malheureusement difficile à estimer. Les quantités de protéines utilisées dans le test de déphosphorylation *in vitro* indiquées sur la Figure 51 correspondent à la quantité totale de protéines de l'éluat.

RESULTATS MALDI-MS									
Nom Echantillon	Fichier MALDI	Identification	[Organisme]	Mw/pi	N° Access	C	Score Mascot	Erreur (ppm)	% recouvr.
					NCBI				
1	A6061 CG	myotubularin	[Homo sapiens]	70401/8,38	4557896	■	462	30	77
2	A6062 CG	molecular chaperone DnaK	[Escherichia coli]	69130/4,83	15799694	■	301	37	54
3	A6063 CG	chaperonin GroEL	[Escherichia coli]	55224/4,84	61679903	■	149	75	50
Nombre d'analyses :				3	Nombre d'identifications :		3	100%	

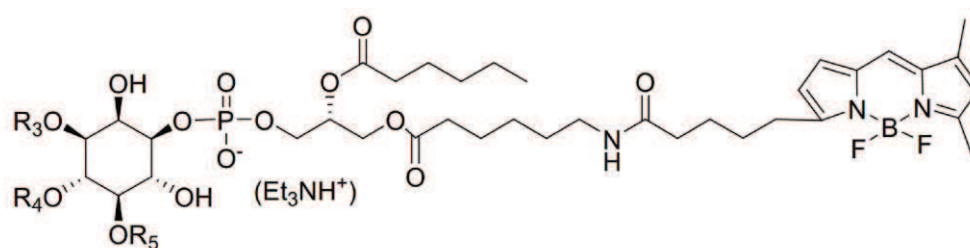
**C : confiance :**

■ : Identification "sûre", □ : Identification probable, résultat peu significatif

**Figure 49 : Analyse par spectrométrie de masse des bandes isolées après séparation sur gel.** La bande à 97 kDa correspond effectivement à la protéine de fusion GST-MTM1. Les résultats ont permis d'identifier les protéines contaminantes comme étant des protéines chaperonnes de la bactérie *E. coli* ayant servi à la production de la protéine humaine MTM1.

## 2. Test d'activité enzymatique *in vitro*

La myotubularine MTM1 sauvage se lie à son substrat le PtdIns3P ou le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> qu'elle déphosphoryle en PtdIns et en PtdIns5P respectivement, alors que le mutant dans le site catalytique MTM1<sup>C375S</sup> est inactif (Blondeau et al., 2000; Schaletzky et al., 2003; Taylor et al., 2000). Afin de déterminer l'activité phosphatase des mutants MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>R69C</sup>, j'ai réalisé une réaction enzymatique *in vitro* en utilisant les protéines purifiées GST-MTM1<sup>WT</sup>, GST-MTM1<sup>C375S</sup>, GST-MTM1<sup>V49F</sup> et GST-MTM1<sup>R69C</sup> en présence des phosphoinositides fluorescents BODIPY<sup>®</sup>-FL-PtdIns3P ou BODIPY<sup>®</sup>-FL-PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (Figure 50). Ces molécules sont couramment utilisées dans des tests de phosphorylations ou de déphosphorylation par des phosphatases ou des kinases à PPIIn.



Structures des BODIPY<sup>®</sup> FL-PtdIns ; R = H ou PO<sub>3</sub>(HNEt<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	Formule chimique	Masse Moléculaire (g/mol)
H	H	H	C <sub>43</sub> H <sub>72</sub> BF <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>14</sub> P	948.83
PO <sub>3</sub> (HNEt <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H	C <sub>55</sub> H <sub>103</sub> F <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> P <sub>2</sub>	1231.19
H	PO <sub>3</sub> (HNEt <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	C <sub>55</sub> H <sub>103</sub> F <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> P <sub>2</sub>	1231.19
H	H	PO <sub>3</sub> (HNEt <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	C <sub>55</sub> H <sub>103</sub> F <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>17</sub> P <sub>2</sub>	1231.19
PO <sub>3</sub> (HNEt <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> (HNEt <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	C <sub>67</sub> H <sub>134</sub> BF <sub>2</sub> N <sub>8</sub> O <sub>20</sub> P <sub>3</sub>	1513.55
PO <sub>3</sub> (HNEt <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	PO <sub>3</sub> (HNEt <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	C <sub>67</sub> H <sub>134</sub> BF <sub>2</sub> N <sub>8</sub> O <sub>20</sub> P <sub>3</sub>	1513.55
H	PO <sub>3</sub> (HNEt <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> (HNEt <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	C <sub>67</sub> H <sub>134</sub> BF <sub>2</sub> N <sub>8</sub> O <sub>20</sub> P <sub>3</sub>	1513.55
PO <sub>3</sub> (HNEt <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> (HNEt <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> (HNEt <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	C <sub>79</sub> H <sub>165</sub> BF <sub>2</sub> N <sub>10</sub> O <sub>23</sub> P <sub>4</sub>	1795.91

**Figure 50 : Structure des BODIPY FL-PtdIns.** Ces PPIIn sont liés à un groupe fluorescent, le BODIPY (boron-dipyrrromethene) (Absorption/Emission : 505/513 nm), permettant de visualiser ces molécules.

Après 30 min d'incubation à 37°C les produits des réactions sont traités puis séparés par chromatographie sur couche mince en plaque de silice. La progression du solvant séparera les différents phosphoinositides selon leur degré de solubilité dans le solvant utilisé allant du moins soluble (ici, le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>), qui migrera lentement et restera donc proche de la ligne de dépôt au plus soluble (ici le PtdIns) qui migrera plus loin dans la plaque de silice. Les PPIIn mono-phosphorylés, le PtdIns3P et le PtdIns5P migreront à mi-distance sur la plaque. Les substrats fluorescents sont visualisés par exposition à un rayonnement ultra-violet.

Après l'essai *in vitro*, la chromatographie révèle que la protéine GST-MTM1<sup>WT</sup> déphosphoryle le PtdIns3P en PtdIns, et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> en PtdIns5P comme cela été démontré

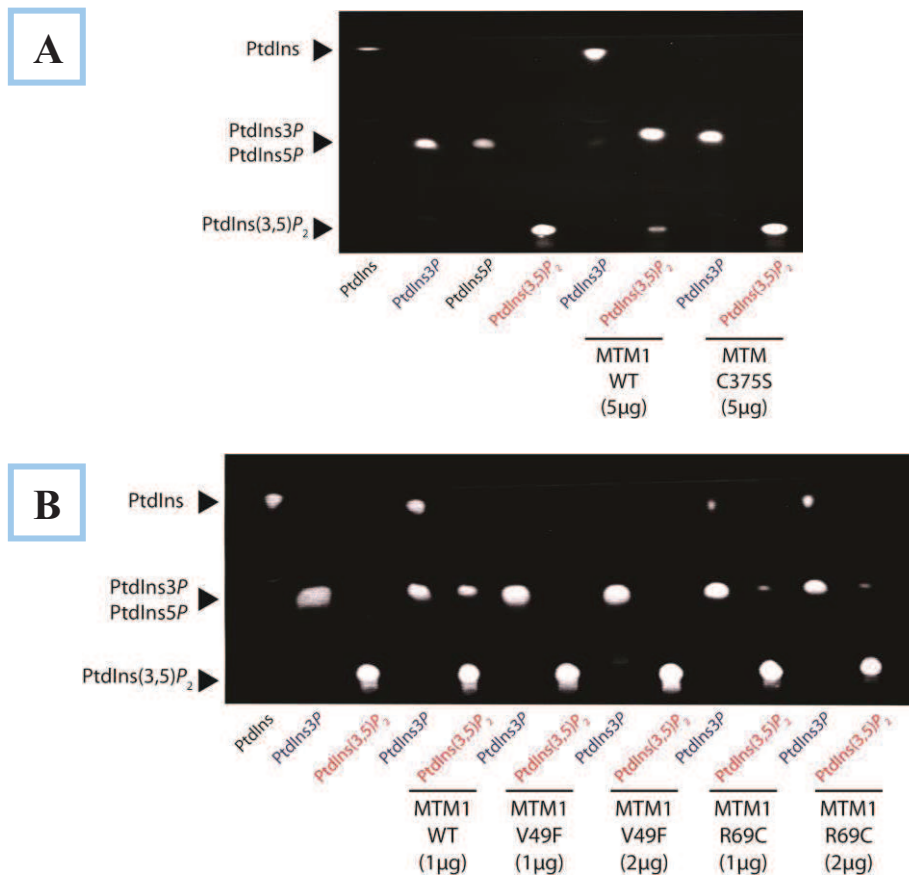
(Blondeau et al., 2000; Schaletzky et al., 2003; Taylor et al., 2000). En guise de contrôle, les analyses sont effectuées en parallèle avec la protéine GST-MTM1<sup>C375S</sup> inactive. Comme cela avait été publié précédemment, aucune conversion des substrats n'a pu être observée pour le mutant MTM1<sup>C375S</sup> (Figure 51A). Par contre, avec les concentrations protéiques utilisées dans cet essai (5µg), à 37°C, la réaction de déphosphorylation du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> par MTM1<sup>WT</sup> n'est pas totale, en effet il reste encore du substrat lipidique non déphosphorylé après la réaction (Figure 51A).

Les résultats montrent que le profil de chromatographie observé après le test de déphosphorylation *in vitro* réalisé avec la protéine GST-MTM1<sup>V49F</sup> est similaire à celui obtenu avec le mutant catalytique inactif MTM1<sup>C375S</sup> (Figure 51B). Ce résultat suggère que MTM1<sup>V49F</sup> présentant une mutation dans le domaine de liaison aux phosphoinositides (domaine PH-GRAM, Figure 31) n'est pas active *in vitro*, du moins à la concentration utilisée. Cependant, la forme MTM1<sup>R69C</sup>, mutée dans ce même domaine PH-GRAM, affiche une activité réduite par rapport à la protéine sauvage. De plus, cette activité augmente en doublant la quantité protéique de GST-MTM1<sup>R69C</sup> utilisée dans le test de déphosphorylation *in vitro*, contrairement à la forme MTM1<sup>V49F</sup> qui n'affiche aucune activité aux deux concentrations de protéines testées (1 µg et 2 µg de protéines pour 0,6 µg de substrat) (Figure 51B).

## **DISCUSSION**

Ces résultats sur l'activité enzymatique des différentes formes de MTM1 recombinantes produites dans *E. coli* sont les premiers que j'ai obtenu concernant la capacité des différents mutants à déphosphoryler le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>. L'expérience montre que les mutations V49F et R69C dans le domaine PH-GRAM affectent l'activité phosphatase de MTM1 *in vitro*. De plus, ces résultats montrent que le mutant MTM1<sup>V49F</sup> ne présente pas d'activité phosphatase aux concentrations utilisées. Quant au mutant MTM1<sup>R69C</sup>, sa capacité à déphosphoryler le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> *in vitro* est clairement réduite par rapport à la protéine sauvage. Ces résultats nous ont surpris étant donné que leur expression chez la levure induisait un phénotype « large vacuole » suggérant qu'elles étaient actives *in vivo*.

D'autre part les mutations sont localisées dans le domaine PH-GRAM de l'enzyme et le domaine catalytique phosphatase de ces deux mutants (MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>R69C</sup>) est intact. En effet, les données concernant le domaine PH-GRAM de MTM1 suggèrent que ce domaine est important pour la localisation de la protéine et qu'il permet le recrutement de MTM1 aux membranes contenant ses substrats, soit par la reconnaissance directe du PtdIns3P et/ou du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, soit par le biais d'interactions protéine/protéine. Par conséquent, *in vivo*, si MTM1



**Figure 51 : Activité enzymatique *in vitro* à partir des différentes formes de GST-MTM1 produites en bactéries.** Différentes formes de la phosphatase MTM1 (WT, V49F ou R69C) ont été incubées avec du PtdIns3P (en bleu) ou du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (en rouge) fluorescents. Les produits de la réaction sont séchés et séparés par chromatographie sur couche mince (TLC) sur une plaque de silice. La distance de migration permet de visualiser les différents phosphoinositides en présence et de déterminer s'il y a eu déphosphorylation ou non. Chaque dépôt contient 0,6 µg de phosphoinositide fluorescent. A) Activité enzymatique de MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>C375S</sup>. B) Activité enzymatique de MTM1<sup>WT</sup>, MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>R69C</sup>. Les valeurs indiquées entre parenthèse en A) et en B) correspondent à la quantité de protéines de l'éluat utilisée pour la réaction.

n'est pas correctement localisée dans la cellule, son rôle dans la déphosphorylation des PPIIn peut être compromis. Or dans mes expériences d'activité phosphatase, les protéines MTM1 ainsi que ses substrats sont libres en solution. Dans de telles conditions, une possible délocalisation des mutants MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> dans un contexte cellulaire ne devrait pas influencer la capacité de ces protéines à déphosphoryler leurs substrats en solution *in vitro* dans une tube. Ainsi, nous nous attendions à ce que les mutants MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> conservent une activité enzymatique au moins égale à la protéine sauvage, ce qui aurait expliqué les phénotypes vacuolaires des levures surexprimant les mutants MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>R69C</sup>.

De plus, la purification de GST-MTM1 produite en bactérie montre que les éluats contiennent de nombreuses contaminations, notamment les protéines chaperonnes GroEL et DnaK. La chaperonine GroEL est même présente en quantité au moins 20 fois supérieure à GST-MTM1.

En conclusion de ces premiers résultats concernant l'activité phosphatase *in vitro* des myotubularines MTM1 produites en bactérie, nous avons pu montrer que la protéine GST-MTM1 sauvage est active *in vitro* et qu'elle convertit le PtdIns3P en PtdIns et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> en PtdIns5P. En revanche, les résultats concernant les mutants MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> ne nous ont pas paru convaincant, principalement en raison des phénotypes vacuolaires observés lors de leurs surexpression. De plus la présence d'une forte contamination dans les extraits « purifiés » rend ces résultats discutables puisqu'au vu de la quantité de chaperonnes co-purifiées avec MTM1, le repliement tridimensionnel des protéines MTM1 est sans doute différent de celui retrouvé en condition physiologique dans des cellules eucaryotes.

Dans l'hypothèse où le domaine PH-GRAM de MTM1 jouerait un rôle dans l'activité phosphatase, la présence d'une étiquette GST de 27 kDa à l'extrémité N-terminale des protéines MTM1, à proximité du domaine PH-GRAM, pourrait aussi influencer la stabilité de domaines déjà fragilisés par la présence de mutations dans ces résidus extrêmement conservés au cours de l'évolution.

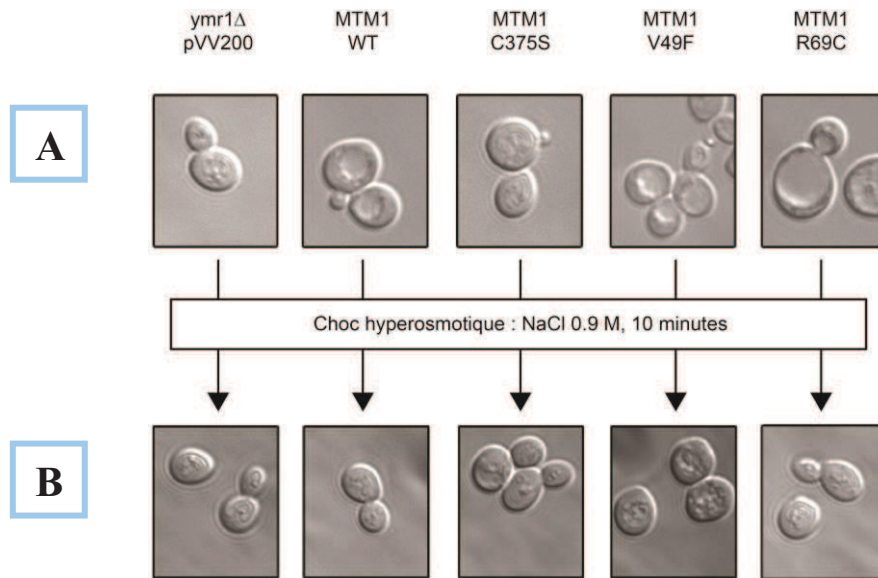
C'est pour ces raisons que nous avons opté pour la purification de protéine MTM1s non étiquetées et produites dans un système eucaryote, à savoir la levure *S. cerevisiae*. Ces résultats sont présentés dans l'article (Figure S4). Dans ces conditions, les mutants MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> présentent effectivement une activité enzymatique comparable à la protéine MTM1<sup>WT</sup> et ces résultats sont en corrélation avec les phénotypes « larges vacuoles » des levures exprimant ces deux mutants.

## **F. MTM1 est recrutée aux membranes dans *S. cerevisiae***

La surexpression de MTM1<sup>WT</sup> dans la levure est responsable d'un élargissement vacuolaire important (Figure 2 de l'article et Figure 52). De manière surprenante, le mutant MTM1<sup>R69C</sup> est à l'origine d'un phénotype « large vacuole » légèrement plus prononcé que la protéine sauvage (Figure 3 de l'article et Figure 52) dans la mesure où le nombre de cellules qui présentent une vacuole remplissant plus de 90% de la cellule est plus élevé dans le cas du mutant MTM1<sup>R69C</sup> que de la protéine sauvage.

Comme ces deux protéines ont une activité phosphatase comparable (Figure 4 de l'article), cette différence pourrait être expliquée par une localisation subcellulaire de la phosphatase MTM1<sup>R69C</sup> distincte de celle de MTM1<sup>WT</sup>. Ainsi le mutant MTM1<sup>R69C</sup> pourraient par exemple être

enrichis au niveau des endosomes, à l'endroit où sont synthétisés les substrats lipidiques des myotubularines.



**Figure 52 : Observation microscopique des phénotypes des levures exprimant différentes formes de MTM1 (DIC 100X). A) Phénotype en des levures *S. cerevisiae ymr1Δ* produisant les différentes formes de MTM1 en condition de culture optimale. B) En condition de stress hyperosmotique, les vacuoles sont fragmentées malgré la présence de myotubularines actives.**

### 1. Les mutations analysées n'affectent pas l'association aux membranes de MTM1

Afin de déterminer quelle était la localisation subcellulaire de MTM1 sauvage ou mutantes produites chez *S. cerevisiae*, et si elles étaient différentes en fonction des mutations, j'ai choisi d'utiliser la méthode de fractionnement subcellulaire. En effet, une analyse par immunofluorescence anti-MTM1 ne semblait pas adaptée car des études de localisation de MTM1 en cellules humaines montrent après observation microscopique une très forte localisation cytoplasmique qui masque le marquage membranaire interne de la protéine (Laporte et al., 2002).

Le fractionnement subcellulaire est une méthode biochimique consistant à séparer dans différentes fractions les membranes des compartiments en fonction de leur coefficient de sédimentation. La myotubularine sera détectée par Western-blot anti-MTM1 dans les différentes fractions :

- **P13**, le culot à 13000xg qui contient les compartiments de grande taille comme la vacuole, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, les débris de membrane plasmique.

- **P100**, le culot à 100 000xg qui contient les compartiments de plus petites tailles comme les endosomes, des fractions de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique, les vésicules de transport intracellulaire.

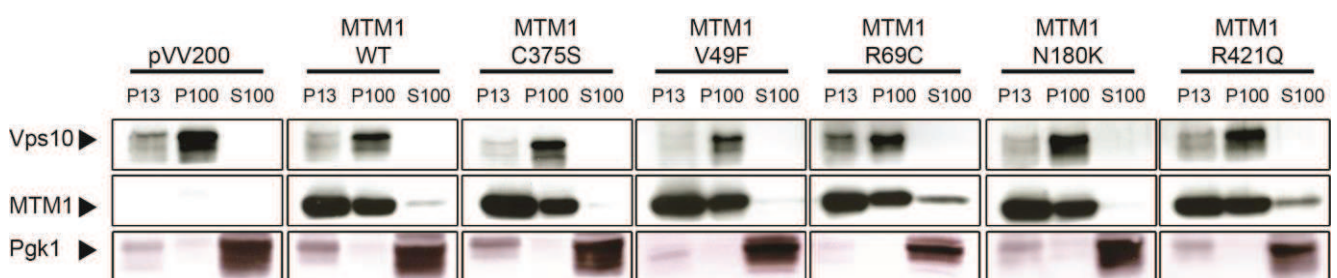
- **S100**, le surnageant à 100 000xg qui contient toutes les protéines du cytosol.

**Bien que ces résultats aient été présentés précédemment en Figure S3 de l'article, je souhaiterais les remonter ici à titre de comparaison avec les résultats complémentaires qui suivent.**

Rappelons simplement que les expériences de fractionnement subcellulaire montrent que :

- la production des différentes formes de MTM1 n'interfère pas avec la distribution des protéines endogènes servant de contrôles (Vps10 et Pgc1) puisque leurs distributions sont similaires à celles observées dans la levure contrôle transformée avec le plasmide sans insert

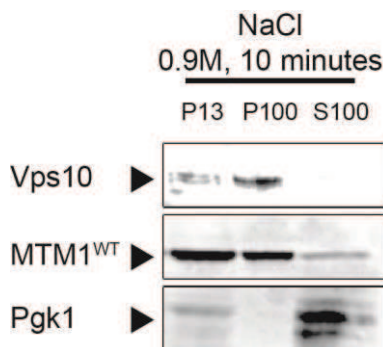
- MTM1 sauvage est détectée majoritairement dans les fractions P13 et P100 associées aux membranes, bien qu'elle ne possède pas de domaine transmembranaire. De même, toutes les formes mutantes MTM1<sup>C375S</sup>, MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup>, MTM1<sup>N180K</sup> et MTM1<sup>R421Q</sup> sont majoritairement distribuées dans les fractions membranaires (P13 et P100), soit un fractionnement similaire à celui de MTM1 sauvage.



**Figure 53 : Fractionnement subcellulaire d'extraits protéiques totaux de levures *ymr1Δ* produisant les différentes formes de MTM1.** MTM1 sauvage est principalement distribuée dans les fractions P13 et P100 associées aux membranes. Les différentes mutations analysées n'affectent pas la distribution des MTM1 mutantes en comparaison à la protéine sauvage.

## 2. Un choc osmotique ne relocalise pas MTM1

Nous avons vu que chez la levure un stress hyperosmotique avec 0,9 M de NaCl stimule la kinase Fab1 et provoque une importante augmentation de PtdIns(3,5) $P_2$  intracellulaire (Bonangelino et al., 2002; Dove et al., 1997). Cette augmentation de PtdIns(3,5) $P_2$  est accompagnée d'une refragmentation de la vacuole même en condition de surexpression d'une myotubularine active. Le PtdIns(3,5) $P_2$  étant reconnu par les myotubularine, j'ai également analysé la distribution de MTM1<sup>WT</sup> dans une levure SEY6210 *yml1Δ* en condition de choc osmotique (Figure 54). En effet, une augmentation massive de PtdIns(3,5) $P_2$  au niveau des endosomes pourrait provoquer la redistribution majoritaire de MTM1<sup>WT</sup> dans la fraction P100, associée aux compartiments endosomaux.



**Figure 54 : Distribution de MTM1 sauvage dans *S. cerevisiae* en condition de choc osmotique.** Un stress osmotique (0.9 M NaCl pendant 10 minutes) ne modifie pas la distribution de MTM1 sauvage dans *S. cerevisiae*.

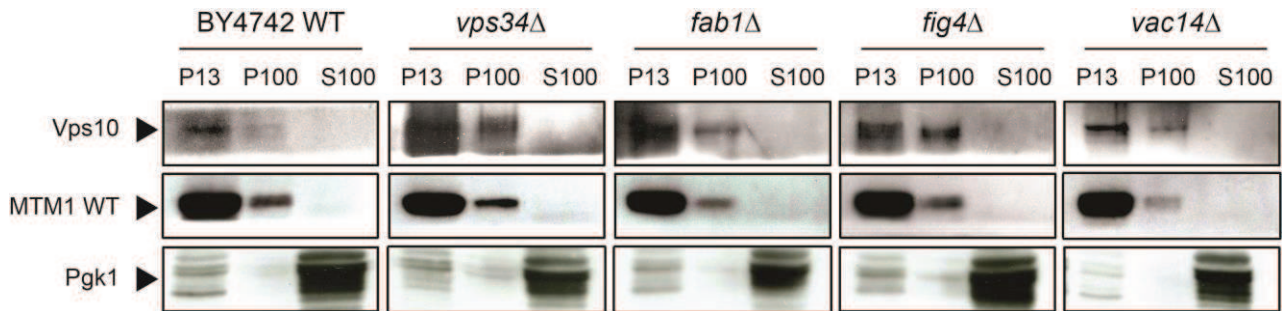
De manière surprenante, l'augmentation de PtdIns(3,5) $P_2$  généré par Fab1 lors d'un choc osmotique, n'induit pas de relocalisation de MTM1<sup>WT</sup> dans *S. cerevisiae*. En effet, la myotubularine sauvage est retrouvée dans les fractions membranaires P13 et P100 de manière similaire à la distribution dans des cellules cultivée en milieu optimal.

## 3. L'association aux membranes de MTM1 ne dépend pas des PPIIn

MTM1 ne possède pas de domaine transmembranaire et pourtant chez *S. cerevisiae* elle est majoritairement localisée dans les fractions associées aux membranes (Figure 53). Dans des cellules humaines, la fraction de MTM1 qui est localisée aux membranes endosomales s'associe au complexe kinase VPS15/VPS34 qui synthétise le PtdIns3P (Cao et al., 2007). De la même façon, chez *S. cerevisiae*, la localisation de MTM1 dans les fractions membranaires P13 et P100 pourrait être due à l'association de l'enzyme au sein d'un complexe impliquant d'autres kinases et/ou



phosphatase de la voie de synthèse du PtdIns3P et du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>. Pour tester cette hypothèse, j'ai déterminé la distribution de MTM1 sauvage par fractionnement subcellulaire dans différentes souches de levures (BY4742) déletées pour les gènes codant pour les kinases Vps34 et Fab1, pour la phosphatase Fig4 ou pour l'activateur Vac14 (Fig. 2). En effet, l'absence du partenaire de MTM1 serait susceptible de délocaliser MTM1 des membranes vers le cytoplasme. Il est important de préciser que la surexpression de MTM1<sup>WT</sup> dans les levures BY4742 et BY4742 *trp1Δ ymr1Δ* induit un élargissement vacuolaire similaire à celui observé dans le fond génétique SEY6210.



**Figure 55 : Distribution de MTM1 WT dans différents mutants du métabolisme des PPIIn.** Analyse de la distribution de MTM1 sauvage dans des levures BY4742 déletées pour des gènes impliqués dans la voie de synthèse du PtdIns3P et du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>. Dans la levure sauvage, MTM1 est localisée dans les fractions associées aux membranes. Dans les mutants de délétion, la distribution de MTM1 est similaire à la levure WT suggérant d'une part que l'absence de ces interactants potentiels n'altère pas la localisation à la membrane de la protéine MTM1 et d'autre part qu'un désordre dans les niveaux de PPIIn n'affecte pas sa distribution dans les fractions associées aux membranes.

Dans les levures sauvages de la souche BY4742, MTM1<sup>WT</sup> est aussi distribuée dans les fractions membranaires P13 et P100, comme dans la levure sauvage souche SEY6210. L'analyse de la distribution de MTM1<sup>WT</sup> dans les différentes levures mutantes pour des enzymes-clés du métabolisme des PPIIn montre que la myotubularine a une distribution semblable chez les levures mutantes et chez la souche sauvage BY4742, à savoir dans les fractions P13 et P100.

## **DISCUSSION**

MTM1 ne possède pas de domaine transmembranaire et est majoritairement localisée dans le cytoplasme des cellules humaines. De manière surprenante, chez *S. cerevisiae*, les expériences de fractionnement subcellulaire montrent une distribution de MTM1 majoritairement dans les fractions associées aux membranes (P13 et P100). En outre, bien que les formes mutantes MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> soient modifiées dans le domaine PH-GRAM de reconnaissance des substrats lipidiques, elles ne montrent pas de différence de distribution, tout comme les mutant MTM1<sup>N180K</sup> et MTM1<sup>R421Q</sup>.

De plus, il est peu probable que la distribution des myotubularines MTM1 dans les fractions membranaires soit due à l'activité phosphatase, en effet le mutant catalytique inactif MTM1<sup>C375S</sup> est également retrouvé dans les fractions associées aux membranes P13 et P100. Pourtant les analyses d'interaction lipidique *in vitro* réalisées au laboratoire ont montré que MTM1 sauvage lie le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, contrairement au mutant MTM1<sup>C375S</sup> pour qui l'affinité pour le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> est fortement diminuée (Figure 46).

Par ailleurs, l'augmentation du pool membranaire de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> en réponse à un choc osmotique (0.9 M NaCl pendant 10 min) (Figure 2 de l'article et Figure 52) ne modifie pas le profil en fractionnement subcellulaire puisque celui-ci présente une distribution similaire de MTM1<sup>WT</sup>. A cela s'ajoute le fait que malgré la délétion du gène codant pour la kinase Vps34 et donc en l'absence de synthèse de PtdIns3P (et indirectement en l'absence de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> synthétisé à partir du PtdIns3P), les différentes myotubularines demeurent associées aux membranes. Ce résultat est confirmé par les résultats identiques obtenus avec la souche *fab1Δ* qui ne synthétise plus de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>. En outre, l'absence de l'activateur Vac14 (qui sert également de plate-forme de recrutement pour tous les effecteurs du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) ou de la phosphatase Fig4 n'affecte pas la distribution subcellulaire de MTM1 qui est semblable à celle observée pour la levure BY4742 sauvage (Figure 55).

Ces résultats confirment d'une part que la localisation aux membranes de MTM1, chez *S. cerevisiae*, est indépendante aussi bien du PtdIns3P que du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>. D'autre part, chez *S. cerevisiae*, la localisation membranaire de MTM1 ne requiert pas la présence des protéines Vps34, Fab1, Vac14 ou Fig4. La localisation membranaire des myotubularines MTM1 chez *S. cerevisiae* ne peut donc pas s'expliquer simplement par une reconnaissance de MTM1 par ses substrats membranaires, le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, ou par une interaction avec Vps34, Fab1, Vac14 ou Fig4.

Pour conclure, la distribution subcellulaire de MTM1 dans les fractions membranaires P13 et P100 n'exclut pas des changements plus fins entre la localisation des myotubularines MTM1<sup>WT</sup> ou mutantes. En effet, une redistribution de MTM1 entre les endosomes précoces (enrichis en PtdIns3P) et tardifs (enrichis en PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) se traduirait, en fractionnement subcellulaire, par la même distribution dans la fraction P100. Je ne peux pas exclure non plus qu'une partie des protéines MTM1 puisse former des aggrégats et que ces structures soient suffisamment denses pour qu'elles soient distribuées dans les fractions membranaires.

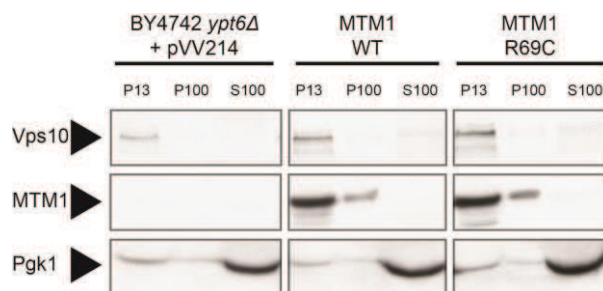
#### 4. La Rab GTPase Ypt6 n'est pas responsable de la distribution membranaire des MTM1 dans *S. cerevisiae*

MTM1 est principalement cytoplasmique dans les cellules humaines mais une activation de la RhoGTPase Rac1 permet la relocalisation de la protéine MTM1 aux niveaux de renflements membranaires dans les cellules de mammifères (Laporte et al., 2002). En réalisant un BLASTP sur génome de *S. cerevisiae*, j'ai pu identifier quatre protéines similaires à la GTPase humaine RAC1 : Cdc42, Rho1, Ypt6 et Rho2. Parmi elles, trois sont essentielles à la survie de la levure et seul le mutant *ypt6Δ* est viable. Chez *S. cerevisiae*, Ypt6 est une Rab GTPase impliquée dans la voie de sécrétion et requise pour la fusion des vésicules dérivées des endosomes avec l'appareil de Golgi. Elle joue également un rôle dans la maturation de la carboxypeptidase Y (CPY), une protéase vacuolaire (Luo and Gallwitz, 2003). Les résultats du BLASTP sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Protéine identifiée par BLASTP	E-value	Viabilité du mutant de délétion
CDC42	6.8e-39	Délétion létale
RHO1	2.2e-25	Délétion létale
YPT6	7e-20	<b>Viable</b>
RHO2	7.5e-14	Délétion létale

**Tableau 3 : Identification par BLASTP de protéines de levures similaires à Rac1 humaine.**  
BLAST réalisé en confrontant la séquence peptidique de la GTPase humaine Rac1 aux protéines de levures.

Pour mieux comprendre la distribution membranaire de MTM1 dans *S. cerevisiae*, j'ai analysé l'implication de la GTPase de levure Ypt6. En effet, cette protéine pourrait être, au moins en partie, suffisamment similaire à la GTPase humaine Rac1 pour relocaliser MTM1 à la membrane. J'ai donc surexprimé les myotubularines MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> à l'aide du plasmide pVV214 (multicopie et promoteur fort PGK) et observé leurs distributions dans un mutant *ypt6Δ*.



**Figure 56 : Distribution en fractionnement subcellulaire de MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> dans une levure *ypt6Δ*.** Fractionnement subcellulaire à partir d'extrait de levures BY4742 délétées pour le gène codant pour la GTPase Ypt6 et surexprimant la myotubularine sauvage ou le mutant du domaine PH-GRAM, MTM1<sup>R69C</sup>. L'absence de Ypt6 n'est pas d'influence sur la distribution membranaire de MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup>.

Les résultats montrent que les levures *ypt6Δ* ne présentent pas de défaut dans la distribution des marqueurs Vps10 et Pgk1 et leurs distributions sont identiques à une levure sauvage BY4742 (Figure 55 et Figure 56). En ce qui concerne la distribution des myotubularines MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup>, dans les deux cas, les protéines sont majoritairement détectées dans les fractions P13 et P100 (Figure 56). L'absence de Ypt6 n'a donc aucune influence sur la localisation aux membranes ni de de MTM1<sup>WT</sup> ni du mutant du domaine PH-GRAM MTM1<sup>R69C</sup>.

## **DISCUSSION**

Ces résultats montrent que la GTPase de levure Ypt6, proche en séquence peptidique de la GTPase humaine Rac1, n'est pas impliquée dans la distribution membranaire des protéines MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup>. Néanmoins il n'est pas surprenant qu'une GTPase de levure ne soit pas responsable de la relocalisation d'une protéine humaine produite de manière hétérologue dans *S. cerevisiae*, car ceci nécessiterait une importante conservation des processus cellulaires entre la levure et l'Homme. En effet il est possible que ce processus d'adressage de MTM1 à la membrane plasmique ait une légitimité dans un organisme pluricellulaire complexe comme les mammifères mais qu'il n'ait pas de réel intérêt dans un modèle d'eucaryote unicellulaire tel que *S. cerevisiae*. Ce mécanisme spécifique pourrait par conséquent ne pas être conservé chez la levure.

### **5. L'association de MTM1 aux membranes est très stable**

Afin de déterminer le type d'interaction responsable de la localisation de MTM1 aux membranes, j'ai entrepris des expériences de solubilisation de MTM1. Pour cela j'ai utilisé divers agents chimiques ou des solutions ioniques que j'ai incubés en présence des extraits protéiques totaux. Puis j'ai séparé les fractions membranaires (P) des fractions solubles (S) par une centrifugation à 100,000xg pendant une heure à 4°C.

Le Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (carbonate de sodium) agit en augmentant l'alcalinité du milieu (augmentation du pH), ce qui favorisera la dissolution de protéines sujettes aux interactions électrostatiques. En présence de NaCl (Chlorure de Sodium) on augmente la force ionique du tampon et les contre-ions ajoutés entoureront les multiples charges ioniques des protéines, ce qui aura pour effet d'augmenter sa solubilité. Le SDS (Dodecylsulfate de Sodium) est un détergent et tensioactif ionique fort, qui dénature les protéines en rompant les liaisons non-covalentes. Quant au Triton X100, il s'agit d'un

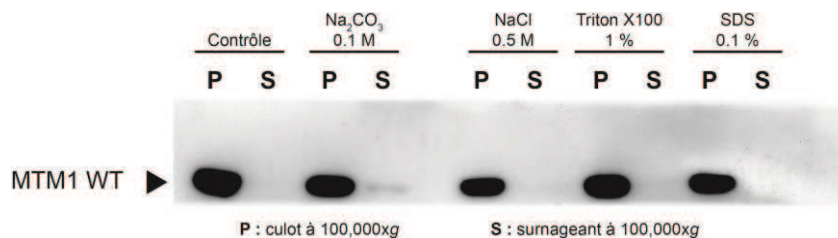
détergent de synthèse qui va solubiliser les lipides membranaires. Ce dernier est souvent utilisé pour isoler des protéines ancrées dans les membranes cellulaires.

Dans cette expérience, je n'ai pas récolté de fraction P13 (culot à 13,000xg) puisque je souhaitais observer une relocalisation de MTM1 des membranes vers le cytoplasme. En effet, suite à la lyse d'une culture de levure SEY6210 *ymr1Δ* transformées avec le plasmide pVV200\_MTM1<sup>WT</sup> j'ai réalisé une courte centrifugation de 5 min à 500xg des extraits protéiques afin d'éliminer les cellules non lysées et les gros fragments de membranes plasmiques. Puis j'ai incubé ces extraits avec les différentes solutions pendant 30 minutes dans la glace. Enfin j'ai effectué une centrifugation à 100,000xg afin de séparer les membranes du cytosol. Ces deux fractions ont été déposées sur gel de polyacrylamide et analysées par Western Blot.

Dans les conditions contrôles, en absence de traitement, MTM1 est distribuée dans la fraction associée aux membranes P (Pellet) et est quasiment indétectable dans la fraction S (Supernatant) de la même manière que décrits dans les précédents résultats (Figure 57).

Un traitement avec 0.1 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ne modifie pas significativement la distribution de MTM1 puisqu'elle reste majoritairement présente dans la fraction P. Cette distribution est la même pour les extraits protéiques traités avec 0.5 M de NaCl, avec 1% de Triton X100 et 0.1% de SDS.

Par conséquent, aucun des agents chimiques ni aucunes des solutions salines n'a été capable de solubiliser MTM1<sup>WT</sup> dans les conditions testées.



**Figure 57 : Solubilisation de la myotubularine MTM1.** Des extraits protéiques de levures *ymr1Δ* produisant MTM1 sauvage ont été mis en présence soit de 0.1M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, de 0.5M de NaCl, de 1% Triton X100 ou de 0,1% de SDS afin de favoriser la dissolution de MTM1 et la relocaliser des membranes vers le cytoplasme. Cependant, aucun des traitements n'a permis de déplacer MTM1 des fractions membranaires (P) vers les fractions solubles (S)

## **DISCUSSION**

J'ai pu montrer ici que l'interaction qui lie MTM1 aux membranes est très forte. En effet, aucun des traitements utilisés n'a permis de solubiliser MTM1. A ce jour, je n'ai pas pu expliquer les raisons de cette distribution dans les fractions membranaires. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour élucider les raisons de cette localisation dans *S. cerevisiae*.

### **DISCUSSION GENERALE concernant la localisation membranaire de MTM1**

Il est très surprenant de voir qu'en condition de surexpression, lors de laquelle une très grande quantité de MTM1 est produite, la quasi-totalité des protéines sont distribuées aux seins de compartiments associés aux membranes lors de fractionnements subcellulaires.

J'ai pu montrert ici que cette distribution dans les fractions membranaires P13 et P100 est indépendante :

- des PPI $\alpha$ , et plus particulièrement des substrats de MTM1, le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> puisqu'une augmentation de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> lors d'un stress osmotique ne modifie pas le profil de distribution de MTM1. Par ailleurs, leur absence, dans un mutant *vps34Δ* par exemple, n'y change rien. Le profil de distribution de MTM1 n'est pas modifié, et ceci quel que soit les variations de PtdIns3P ou de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> intracellulaires.
- des protéines Vps34, Fab1, Vac14 ou Fig4. En effet, dans les levures mutantes *vps34Δ*, *fab1Δ*, *vac14Δ* et *fig4Δ* produisant MTM1<sup>WT</sup>, la myotubularine reste présente dans les mêmes fractions lors de fractionnements subcellulaires. Pourtant dans les cellules humaines, MTM1 est recrutée aux endosomes par le complexe kinase VPS15/VPS34. De manière surprenante, mes résultats montrent que l'absence de Vps34 ne modifie sa distribution.
- de la GTPase de levure Ypt6. Cette dernière ne remplit donc pas les mêmes fonctions que la GTPase humaine Rac1 qui est impliquée dans la relocalisation de MTM1 au niveau de renflements membranaires dans les cellules humaines produisant une forme constitutivement active de Rac1 (Laporte et al., 2002).

La localisation membranaire des myotubularines MTM1 (sauvages ou mutantes) dans *S. cerevisiae* est identique quelle que soit la mutation faux-sens analysée. De ce fait, ces mutations ponctuelles ne semblent pas influencer sur la capacité de MTM1 à être distribuée dans les fractions membranaires dans des expériences de fractionnement subcellulaires.

Je ne peux pas cependant pas exclure la possibilité que la surproduction de MTM1 dans la levure puisse être à l'origine de la formation d'aggrégats protéiques de hauts poids moléculaires fractionnant avec les membranes cellulaires. Par ailleurs cette distribution membranaire est

remarquablement résistante aux différents traitements de solubilisation testés ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaCl, SDS et Triton X100). En outre, la détection en Western Blot, en condition dénaturante, de MTM1 n'a pas permis de mettre en évidence d'oligomères de myotubularines. En effet, la myotubularine MTM1 n'a toujours été détectée que sous sa forme monomérique.

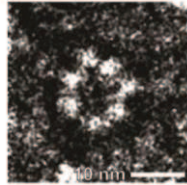
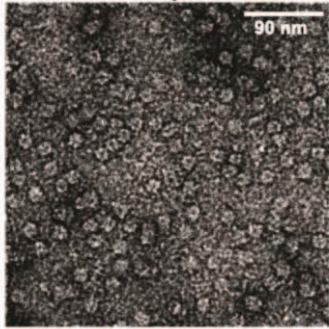
Néanmoins si MTM1 est sous forme d'aggrégats de haut poids moléculaires résistants au SDS, il est possible que ces structures soient suffisamment imposantes pour ne pas pénétrer dans le gel et rester bloquées au niveau des puits de dépôt. Ceci est peu probable puisque l'analyse de la partie supérieure du gel de polyacrylamide correspondant au gel de concentration et comprenant les puits de dépôts, ne m'a pas permis de détecter de protéines MTM1.

Une autre possibilité pouvant expliquer que la quasi-totalité de MTM1 soit membranaire dans la levure vient de l'observation réalisée par Schaletzky et coll.. En effet, leurs travaux montrent que MTM1 est capable non seulement de s'homodimériser, mais également de former des oligomères en anneau composé de sept myotubularines en présence de PtdIns5P (Schaletzky et al., 2003) (Figure 58). Ainsi, de telles structures pourraient permettre le recrutement d'une grande proportion de myotubularines produite dans *S. cerevisiae* et limiter fortement la présence de MTM1 dans le cytoplasme.

Bien que je n'ai pas pu mettre en évidence les raisons de cette localisation membranaire, nos résultats montrent sans ambiguïté que les myotubularines MTM1<sup>WT</sup>, MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup> et MTM1<sup>N180K</sup> sont actives *in vivo* dans la levure sous cette forme membranaire et que leurs activités phosphatases sont à l'origine des morphologies vacuolaires élargies observées. De plus, ces phénotypes vacuolaires sont d'autant plus visibles que la production d'une myotubularine active est importante. En effet, les élargissements vacuolaires sont plus prononcés dans les cellules produisant une myotubularine active et transformées par le plasmide pVV200 (épisomique, haut nombre de copies, promoteur fort PGK) que dans le cas des cellules transformées avec un plasmide pVV204 (centromérique, 1-3 copies par cellule, promoteur bactérien TetO).

Par conséquent, si les myotubularines produites sont regroupées sous la forme d'aggrégats, il n'en reste pas moins qu'elles conservent une activité enzymatique, révélées par dosage des PPI<sub>n</sub> intracellulaires (Figures de l'article) et que cette activité est à l'origine d'une perturbation du trafic intracellulaire résultant en une morphologie vacuolaire aberrante.

MTM1 + PtdIns3P + PtdIns5P



**Figure 58 : MTM1 est capable de s'oligomériser en heptamère.** Les tests d'activité phosphatase de MTM1 en présence de PtdIns3P et de PtdIns5P ont été déposés sur une grille de cuivre et analysés par microscopie électronique. En présence de PtdIns5P, MTM1 est capable de former des structures en anneau composés de 7 unités de MTM1. Grossissement 35,000X.

## **G. Effets de la surexpression de MTM1 dans *S. cerevisiae* sur diverses voies du trafic dépendants des PPIIn**

La surexpression d'une myotubularine active dans *S. cerevisiae* résulte en phénotype « large vacuole ». Cet élargissement vacuolaire est directement lié à l'activité phosphatase de MTM1 puisque la production d'un mutant catalytique inactif MTM1<sup>C375S</sup> n'induit pas d'altération de la morphologie vacuolaire. Ces observations suggèrent donc que la surexpression d'une myotubularine active est à l'origine d'un désordre du trafic intracellulaire, résultant en une anomalie de la morphologie vacuolaire.

Dans cette partie, je présenterai les résultats que j'ai obtenus concernant l'analyse des effets de la surexpression de MTM1 sur diverses voies du trafic dépendant des PPIIn.

### **1. Les myotubularines actives induisent une sécrétion de CPY**

Chez *S. cerevisiae*, les protéines qui empreignent la voie du trafic VPS (Vacuolar Protein Sorting) à destination de la vacuole sont écartées des cargos de sécrétion et des protéines de la membrane plasmique à un stade tardif dans l'appareil de Golgi. De ce fait, elles acquièrent toutes les modifications qui ont lieu dans le réticulum endoplasmique et dans les stades précoces de l'appareil de Golgi telles que la glycosylation et les étapes de maturation protéolytique.

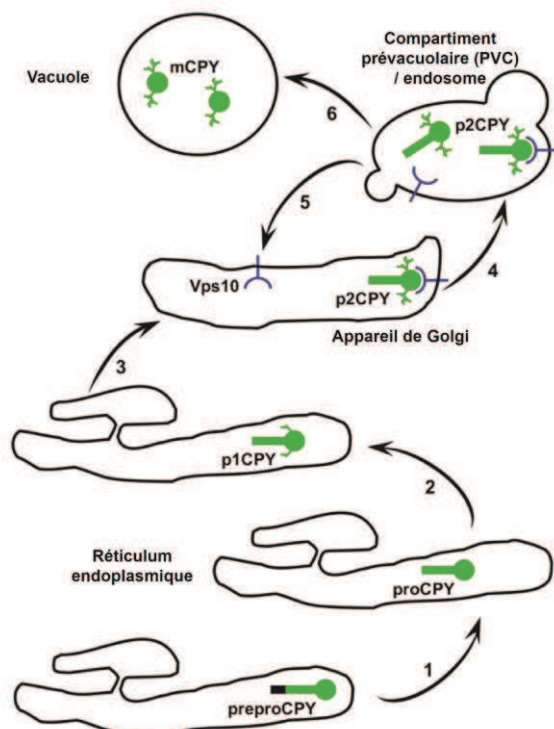


## Partie II : Résultats et Discussion - Effets de la surexpression de MTM1 dans *S. cerevisiae* sur diverses voies du trafic dépendants des PPIIn

L'un des exemples les mieux caractérisés est celui l'hydrolase vacuolaire soluble CPY (Carboxypeptidase Y, ou protéinase C). Cette protéase est encodée par le gène *PRC1* (Johnson et al., 1987; Stevens et al., 1982) et va subir plusieurs étapes de maturation.

CPY est synthétisée dans un premier temps sous la forme d'un précurseur inactif, la pre-proCPY qui est libérée dans le lumen du réticulum endoplasmique. Le peptide-signal hydrophobe amino-terminal va alors être éliminé et la CPY subira encore quelques modifications post-traductionnelles. L'intermédiaire formé, la p1CPY, est ensuite transporté vers l'appareil de Golgi pour y recevoir d'autres modifications, générant un second intermédiaire, la p2CPY. En condition normale, la p2CPY est écartée des protéines empruntant les voies de trafic vers la membrane plasmique en se liant à son récepteur Vps10 (l'homologue du récepteur du mannose-6-phosphate MPR) et sera ainsi adressée vers le compartiment prévacuolaire (PVC) ou endosome avant de rejoindre la vacuole. Lorsque la p2CPY est livrée dans le lumen de la vacuole, elle est digérée par une autre protéase vacuolaire pour générer la forme active mature de CPY (Figure 59).

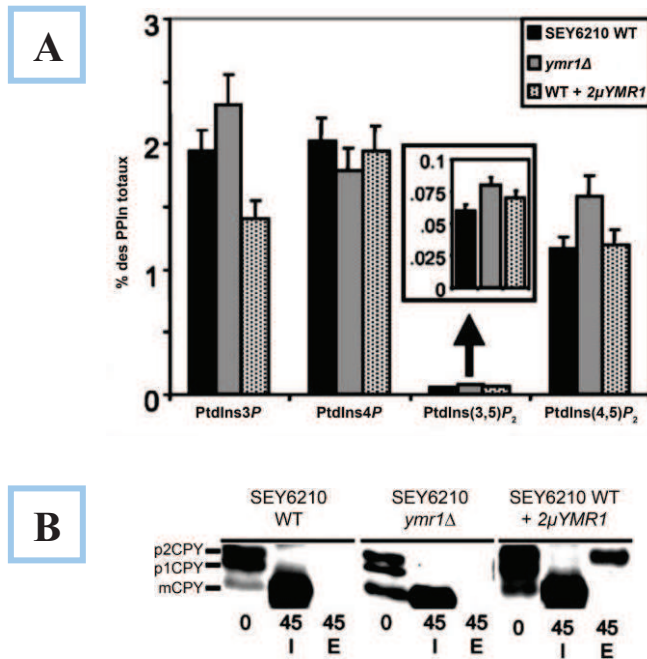
Plusieurs études ont montré que des défauts dans le tri des protéines au niveau du trans Golgi sont responsables de l'adressage de la p2CPY à la membrane plasmique par la voie de sécrétion. Cette particularité a été exploitée par de nombreuses équipes pour isoler des mutants de la voie VPS, tel que *vps34Δ* ou *vps27Δ* (Piper et al., 1995; Rothman et al., 1989; Rothman and Stevens, 1986; Valls et al., 1987). Ces études montrent également que Vps34, la kinase synthétisant le PtdIns3P, joue un rôle essentiel dans le tri des protéines à destination vacuolaire.



**Figure 59 : Tri de la protéase vacuolaire CPY via la voie VPS.** CPY est synthétisée au réticulum endoplasmique (RE) sous une forme précurseur inactive, la pre-pro-CPY. Dans le lumen du RE, elle est protéolysée en pro-CPY (1). Après glycosylation, la CPY devient la forme p1CPY de 67kDa (2). Puis p1CPY est transportée vers l'appareil de Golgi pour y être modifiée une nouvelle fois et générer la forme p2CPY de 69kDa (3). Dans le Golgi, p2CPY se fixe à son récepteur Vps10 et est adressée vers les endosomes/PVC, une voie distincte de celle à destination de la membrane (4). Dans le PVC, p2CPY se détache de Vps10, lequel est recyclé vers l'appareil de Golgi pour y être réutilisé (5). Dans le lumen de la vacuole, p2CPY est clivée par des protéases pour générer la forme mature mCPY de 61kDa (6).

## Partie II : Résultats et Discussion - Effets de la surexpression de MTM1 dans *S. cerevisiae* sur diverses voies du trafic dépendants des PPIn

Le PtdIns3P joue un rôle essentiel dans la voie VPS et dans la maturation de CPY chez *S. cerevisiae* (Parrish et al., 2004; Strahl and Thorner, 2007). En effet, la surexpression dans *S. cerevisiae* de *YMR1* provoque la diminution des niveaux intracellulaires de PtdIns3P accompagnée d'un défaut d'adressage de la CPY. En effet, en surexpression de *YMR1*, une partie de la CPY est sécrétée dans le milieu extracellulaire sous la forme p2CPY non mature. Cependant, la délétion de *YMR1* n'induit aucun défaut de maturation de la CPY (Figure 60). Ainsi, Ymr1 déphosphoryle le pool de PtdIns3P impliqué dans le processus de maturation de la CPY.



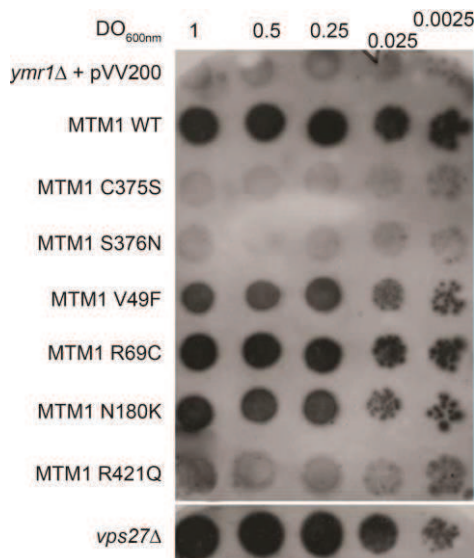
**Figure 60 : Ymr1 hydrolyse un pool de PtdIns3P impliqué dans la voie VPS. A)** La délétion et la surexpression de *YMR1* modifie les niveaux intracellulaires de PtdIns3P. Les cellules ont été marquées en ajoutant du myo-[2-<sup>3</sup>H]inositol à 26°C pendant 60 minutes. Puis les lipides ont été extraits, déacylés et analysés par HPLC. **B)** La surexpression de *YMR1* induit la sécrétion d'un pool de CPY dans le milieu extracellulaire. La délétion de *YMR1* n'a cependant pas d'effet sur la maturation de CPY. Les cellules ont été marquées métaboliquement à la Méthionine[<sup>35</sup>S] pendant 10 minutes et lavées avec un excès d'acides aminés après les temps indiqués. Les pools intracellulaires (I) et extracellulaires (E) ont été analysés par SDS-PAGE. Les différentes formes de CPY sont indiquées. D'après (Parrish et al., 2004).

Au vu de ces résultats, j'ai analysé les effets de MTM1 sur la sécrétion de CPY chez *S. cerevisiae*. En effet, si Ymr1 et MTM1 déphosphorylent le PtdIns3P endosomal, la surexpression de MTM1 devrait également induire la sécrétion de CPY dans le milieu extracellulaire.

Pour cela, j'ai réalisé un test en goutte à partir de cellules SEY6210 *ymr1Δ* transformée soit avec un plasmide de surexpression pVV200 vide, soit portant les différentes formes de MTM1. Les cellules ont été déposées sur milieu gélosé maintenant la sélection du plasmide sous forme de gouttes en concentration décroissante. Après séchage des gouttes, une membrane de nitrocellulose a été déposée à la surface de la gélose, en contact avec les cellules et les boîtes ont été incubées pendant 72 heures à 30°C. A la suite de quoi, la membrane a été récupérée et lavée pour éliminer les cellules de la membrane. Puis la membrane est bloquée à l'aide d'une solution de PBS1X, Tween 0,1% additionnée de 4% de lait en poudre pendant 1h à température ambiante. Enfin, la

## Partie II : Résultats et Discussion - Effets de la surexpression de MTM1 dans *S. cerevisiae* sur diverses voies du trafic dépendants des PPIIn

membrane a été lavée et incubée avec des anticorps anti-CPY. L'immunodétection est réalisée de la même manière que pour un Western Blot traditionnel. En contrôle, la souche *vps27Δ* a été utilisée. En effet, cette dernière présente un important défaut de tri des protéines au niveau des endosomes qui induit la sécrétion de CPY dans le milieu extracellulaire (Bilodeau et al., 2002; Piper et al., 1995).



**Figure 61 : Analyse de la sécrétion de CPY dans des levures produisant les différentes formes de MTM1.** Les levures SEY6210 *ymr1Δ* ont été déposées en goutte en concentration décroissante, incubées 72h en contact avec une membrane de nitrocellulose. Puis la membrane est lavée pour éliminer les cellules attachées et la CPY est immunodétectée à la manière d'un Western Blot classique. Les levures produisant une forme enzymatiquement active de MTM1 présentent une importante sécrétion de CPY dans le milieu extracellulaire. En contrôle, la souche *vps27Δ*, rapportée comme présentant d'importants défauts de tri protéique et sécrétant la CPY a été utilisée.

Mes résultats confirme d'une part que la souche mutante *ymr1Δ* ne sécrète pas de CPY dans le milieu extracellulaire et d'autre part que la souche *vps27Δ* sécrète fortement la CPY, comme cela a été démontré auparavant (Parrish et al., 2004; Piper et al., 1995).

En présence d'une forme active de myotubularine (MTM1<sup>WT</sup>, MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup> et MTM1<sup>N180K</sup>) les cellules sécrètent de la CPY. Par ailleurs, l'intensité de la sécrétion est en parfaite corrélation avec l'activité phosphatase des différentes myotubularines. En effet, MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> sécrètent fortement la CPY et à des niveaux comparables. Le mutant MTM1<sup>N180K</sup> induit la sécrétion à des niveaux légèrement plus faibles en comparaison à la protéine sauvage mais plus élevés que le mutant MTM1<sup>V49F</sup> (Figure 61). En revanche, les mutants inactifs MTM1<sup>C375S</sup>, MTM1<sup>S376N</sup> et MTM1<sup>R421Q</sup> ne sécrètent pas de CPY soit des résultats comparables aux levures transformées avec le plasmide vide.

Ces données suggèrent donc que les myotubularines MTM1<sup>WT</sup>, MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup> et MTM1<sup>N180K</sup> déphosphoryle in vivo, dans *S. cerevisiae*, les mêmes pools de PtdIns3P que Ymr1 et que la surexpression de *YMR1* ou des mutants actifs de *MTM1* sont à l'origine du même défaut de trafic à l'origine de la sécrétion de CPY.

## **DISCUSSION**

Mes résultats montrent une fonction cellulaire commune entre la myotubularine de levure Ymr1 et la myotubularine humaine MTM1 dans *S. cerevisiae*. En effet, ces deux homologues de myotubularines, en surexpression, dans *S. cerevisiae*, déphosphorylent un pool de PtdIns3P endosomal essentiel pour l'intégrité du tri de protéines de la voie « Vacuolar Protein Sorting (VPS) ». De plus, les différences dans les niveaux de CPY sécrétés sont en corrélation directe avec l'activité phosphatase des différentes formes de MTM1. En d'autre terme, plus une myotubularine est active et plus elle va perturber le trafic de la voie VPS et plus elle va induire le détournement de CPY vers la voie de sécrétion. Ces observations montrent donc que MTM1 a une fonction de déphosphorylation de PtdIns3P au niveau des endosomes chez *S. cerevisiae*.

Par ailleurs, ces résultats sont également en défaveur de l'hypothèse selon laquelle MTM1<sup>C375S</sup> et MTM1<sup>S376N</sup> seraient des mutants « piègeant » les substrats (« substrat-trap »). En effet, si ces mutants se lient au PtdIns3P endosomal, ils devraient le dissimuler « aux yeux » des autres protéines effectrices reconnaissant le PtdIns3P. En effet, si ces deux myotubularines sont « substrat-trap », elles devraient induire la sécrétion de CPY au même titre que les myotubularines actives, par simple titration du PtdIns3P.

Enfin, mes résultats ne tiennent pas compte de la maturation de la CPY intracellulaire puisque je n'ai analysé ici que la CPY sécrétées dans le milieu extracellulaire. Parrish et coll. ont montré que la surexpression de Ymr1 induisait la sécrétion d'une partie de p2CPY, tandis que la totalité de la CPY intracellulaire était sous sa forme mature (Figure 60). Il est possible que la double spécificité de MTM1 à l'encontre du PtdIns3P et du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> alors que Ymr1 déphosphoryle préférentiellement le PtdIns3P puisse avoir des effets supplémentaires non visibles dans cette expérience. Je ne peux pas non plus affirmer que la CPY sécrétée dans cette expérience est sous sa forme p2CPY.

Pour conclure, cette analyse de la sécrétion de CPY montrent un effet de MTM1 sur le trafic intracellulaire dépendant du PtdIns3P, notamment la voie VPS et que cet effet est directement lié à l'activité phosphatase des myotubularines.

## **2. MTM1 n'affecte pas la maturation de Ape1 dans *S. cerevisiae***

Il est clairement démontré aujourd'hui que les PPIIn et plus particulièrement le PtdIns3P jouent un rôle essentiel dans le trafic des protéines de l'appareil de Golgi à destination de la vacuole (Botelho, 2009; De Camilli et al., 1996; De Matteis and Godi, 2004; Lindmo and Stenmark, 2006; Odorizzi et al., 2000; Roth, 2004).

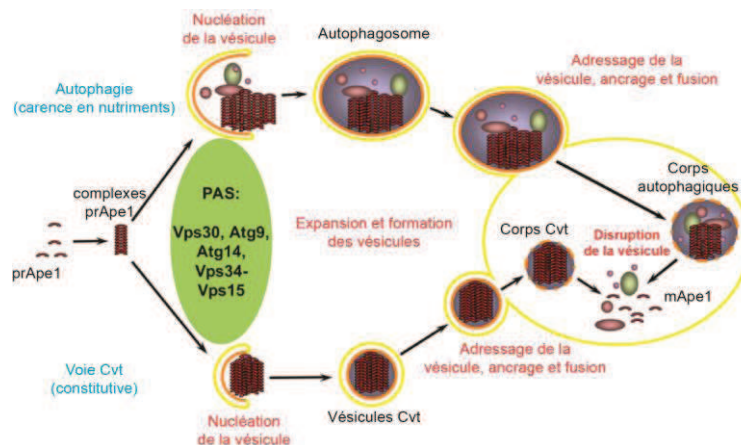
Néanmoins d'autres processus cellulaires sont dépendants des PPIIn et il a été montré que la kinase Vps34 est impliqué non seulement dans la synthèse du PtdIns3P au niveau des endosomes précoces mais qu'elle joue également un rôle dans l'autophagie aussi bien chez la levure *S. cerevisiae* (Strahl and Thorner, 2007; Wang and Klionsky, 2003) que chez l'Homme (Noda et al., 2010; Vergne and Deretic, 2010).

L'autophagie est un processus cellulaire au cours duquel du matériel intracellulaire est compartimenté dans un autophagosome en vue de le dégrader dans le lysosome/vacuole. Ainsi l'autophagie permet non seulement de dégrader du contenu cytoplasmique, mais aussi des complexes protéiques ou des organelles. L'autophagie est induite en condition de carence en nutriments mais peut également être activée en réponse à une stimulation hormonale chez les mammifères. Chez la levure, en milieu riche, il existe une voie biosynthétique constitutive appelée la voie Cvt (pour Cytoplasm to Vacuole Targeting). Cette voie utilise globalement la même machinerie moléculaire que pour l'autophagie et est responsable de la formation de vésicules de même topologie que l'autophagosome afin de délivrer l'hydrolase vacuolaire Ape1 (Aminopeptidase 1) dans le lumen de la vacuole. Contrairement à la voie autophagique, activée en réponse à une carence en nutriment, la voie Cvt est constitutivement active même en milieu riche (Figure 62).

Durant le processus autophagique, le cytoplasme ou les organelles sont enveloppés dans une structure à double membrane, nommée autophagosome. La destinée de l'autophagosome est de fusionner avec la membrane de la vacuole afin de libérer son contenu dans le lumen de la vacuole afin de le soumettre aux protéases vacuolaires. En condition de carence, ce processus permet de recycler les acides aminés et les nucléotides pour assurer la survie cellulaire.

Chez *S. cerevisiae*, le complexe Vps34/Vps15 s'associe à Vps30 et Vps38 et joue un rôle essentiel dans la voie VPS, notamment pour la maturation de CPY. De manière intéressante Vps38 est essentiellement retrouvée au niveau des endosomes où ce complexe officie. Le complexe

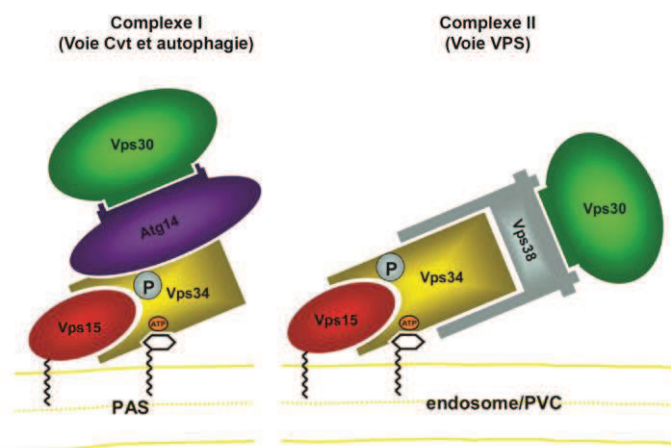
Vps34/Vps15/Vps30/Vps38 est nommé « complexe II » et sa fonction est donc d'assurer le tri des protéines de la voie VPS (Figure 63).



**Figure 62 : Représentation schématique des voies d'autophagie et Cvt chez la levure.** L'aminopeptidase Ape1 est synthétisée sous une forme précurseur immature prApe1 dans le cytoplasme et empreinte les deux voies afin de rejoindre le lumen de la vacuole où les protéases vacuolaires achèveront sa maturation pour générer sa forme mature mApe1. D'après (Strahl and Thorner, 2007).

Cependant, le complexe Vps34/Vps15 peut également s'associer avec les protéines Vps30 et Atg14. L'association avec Atg14 (au lieu de Vps38 dans le complexe I) va permettre le recrutement du complexe Vps34/Vps15/Vps30/Atg14 au niveau des structures pré-autophagosomales (PAS). Ce second complexe contenant Vp34, Vps15 et Vps30 est appelé « complexe I » et il fonctionne également dans la voie Cvt (Figure 63).

Ces deux complexes fonctionnent de manière indépendante bien qu'ils soient constitués du même noyau Vps34/Vps15/Vps30. Il a été suggéré que le complexe Vps34/Vps15 pourrait par ailleurs avoir d'autres fonctions cellulaires étant donné que les mutants *vps34Δ* et *vps15Δ* présentent des phénotypes additionnels non observés chez un mutant *vps30Δ*. La génération du PtdIns3P dépendante de Vps34 est donc essentielle dans au moins deux grandes voies cellulaires de *S. cerevisiae* : la voie VPS et l'autophagie/Cvt.



**Figure 63 : Complexes PtdIns 3-kinase contenant Vps34/Vps15/Vps30 chez la levure.** Chez *S. cerevisiae*, Vps34 est retrouvée dans au sein de deux complexes indépendants impliqués dans deux processus cellulaires distincts : la voie Cvt/autophagie pour le complexe I, la voie VPS pour le complexe II. D'après (Strahl and Thorner, 2007).

Concernant le rôle des myotubularines dans l'autophagie chez l'Homme, deux articles récents indépendants ont montré l'implication de deux membres de la famille des myotubularines dans l'autophagie.

La première étude montre que MTMR14 (également appelée Jumpy) régule négativement l'autophagie dans des myoblastes C2C12 de souris. En effet, l'inactivation de MTMR14/Jumpy par des ARN interférents induit une augmentation de l'activité autophagique à la fois en milieu riche en nutriments et en condition de carence. Cette régulation de l'autophagie est dépendante de l'activité PtdIns3P 3-phosphatase de MTMR14/Jumpy puis qu'un mutant catalytique inactif R336Q perd la capacité de réguler négativement l'autophagie (Vergne et al., 2009).

La seconde étude a identifié MTMR3 comment étant impliquée dans la formation et la maintenance des autophagosomes dans des cellules A549 humaines. Leurs résultats montrent que l'autophagie est induite par l'augmentation locale de PtdIns3P dans des cellules exprimant la forme inactive MTMR3<sup>C413S</sup>. Par ailleurs, la surexpression de MTMR3<sup>WT</sup> réduit considérablement l'autophagie (Taguchi-Atarashi et al., 2010).

Ces deux travaux montrent pour la première fois que la régulation de l'activité PtdIns 3-kinase de Vps34 n'est pas le seul moyen de contrôler le processus autophagique mais démontrent l'implication de PtdIns3P 3-phosphatases de la famille des myotubularines, MTMR14/Jumpy et MTMR3, dans la régulation de l'autophagie.

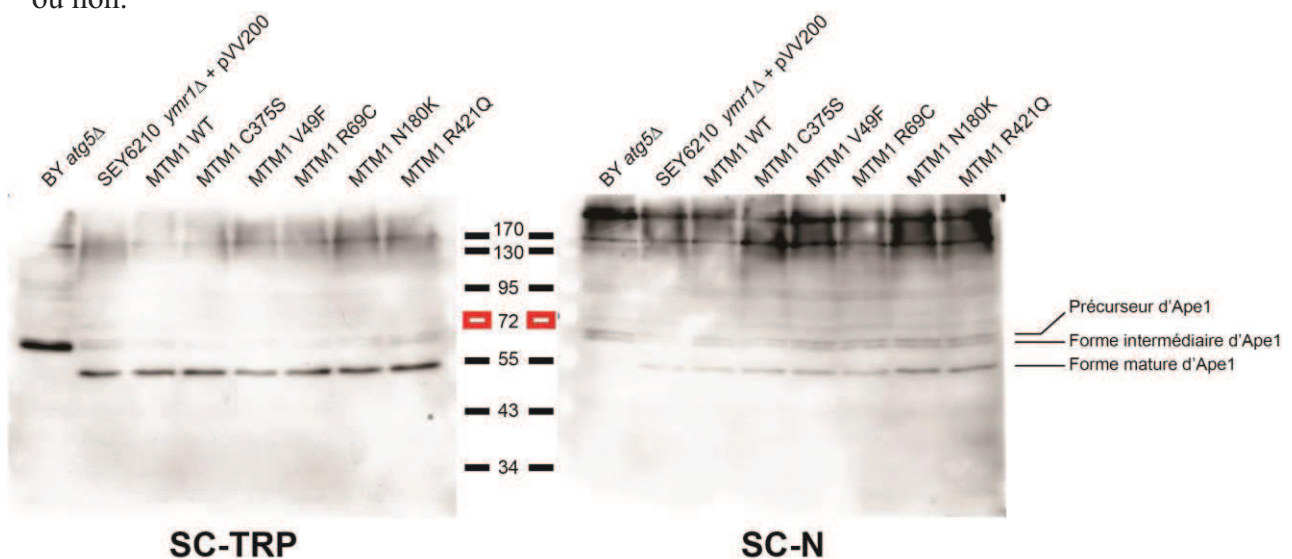
Dans le but d'analyser un possible effet de MTM1 sur la voie Cvt et l'autophagie, j'ai analysé la maturation de l'aminopeptidase 1 (Ape1) dans *S. cerevisiae* en milieu riche ou en milieu carencé en azote (donc en autophagie). En milieu riche, la voie autophagique n'est pas activée et la voie Cvt, constitutivement active, est en charge de délivrer le précurseur prApe1 dans le lumen de la vacuole où la forme mature mApe1 est générée par l'action des protéases vacuolaires. En condition de carence azotée, l'autophagie est activée et l'aminopeptidase empreinte les deux voies (autophagique et Cvt). En contrôle, une souche *atg5Δ* est utilisée. Cette dernière est mutée dans le gène codant pour une protéine essentielle à la formation des autophagosomes et des vésicules de la voie Cvt. Par conséquent, dans un mutant *atg5Δ*, Ape1 n'est pas délivrée dans la vacuole et demeure sous sa forme précurseur immature.

Mes résultats montrent que la maturation de Ape1 est effectivement affectée chez le mutant *atg5Δ* aussi bien en milieu riche qu'en milieu sans azote puisque Ape1 n'est détectée que sous sa

## Partie II : Résultats et Discussion - Effets de la surexpression de MTM1 dans *S. cerevisiae* sur diverses voies du trafic dépendants des PPIIn

forme immature (Figure 64). De plus chez la levure *ymr1Δ* transformée avec le plasmide pVV200 vide, il n'y a pas de défaut majeur de maturation de Ape1. La présence des différentes formes de myotubularines n'altère pas la maturation de Ape1 en milieu riche, qu'elles soient enzymatiquement actives ou non (Figure 64).

En milieu d'autophagie, la maturation de Ape1 ne semble pas non plus affectée par la présence de l'une ou l'autre myotubularine puisque le ratio « précurseur de Ape1 / Ape1 mature » ne présente pas de variations apparentes selon que la levure produise une forme active de MTM1 ou non.



**Figure 64 : Analyse des effets des différentes formes de MTM1 sur la voie d'autophagie et la voie Cvt dans *S. cerevisiae*.** La maturation de l'aminopeptidase 1 (Ape1) nécessite son transport à partir du cytoplasme vers le lumen de la vacuole. Pour cela, Ape1 peut empreinter la voie Cvt, activée constitutivement même en milieu riche, ou la voie d'autophagie activée par une carence en nutriments. L'analyse par Western Blot des différentes formes de Ape1 (de la forme précurseur immature à la forme mature) permet de déterminer si ces deux voies sont affectées par la présence des différentes myotubularines. SC-TRP : milieu complet sans Tryptophane (pour maintenir le plasmide). SC-N : milieu carencé en azote, induisant l'autophagie.

### DISCUSSION

Le rôle de Ymr1 dans l'autophagie n'a pas été examiné. Mais mes résultats suggèrent que les levures *ymr1Δ* ne présentent pas de défauts majeurs ni dans la voie autophagique ni dans la voie Cvt. Cependant en absence de l'analyse d'une levure SEY6210 sauvage en guise de contrôle, je ne peux pas exclure que la délétion de *YMR1* n'ait pas un effet mineur sur la voie Cvt ou l'autophagie. Par ailleurs, la maturation de Ape1 ne semble perturbée ni par la présence d'une myotubularine, ni par son activité phosphatase.

Par conséquent, il est envisageable que MTM1 déphosphoryle un sous-groupe de PtdIns3P différents de celui généré par le complexe I dans *S. cerevisiae* de sorte que la présence d'une myotubularine MTM1 active n'affecte pas les voies Cvt et d'autophagie.



### **3. Les MTM1 actives induisent un retard dans le tri de Fur4-GFP aux endosomes**

Un des avantages de la levure est que nous disposons de nombreux marqueurs permettant de suivre les différentes voies du trafic intracellulaires (Figure 67). Parmi eux l'uracile perméase Fur4 est un bon marqueur pour le suivie du processus d'endocytose dans *S. cerevisiae*.

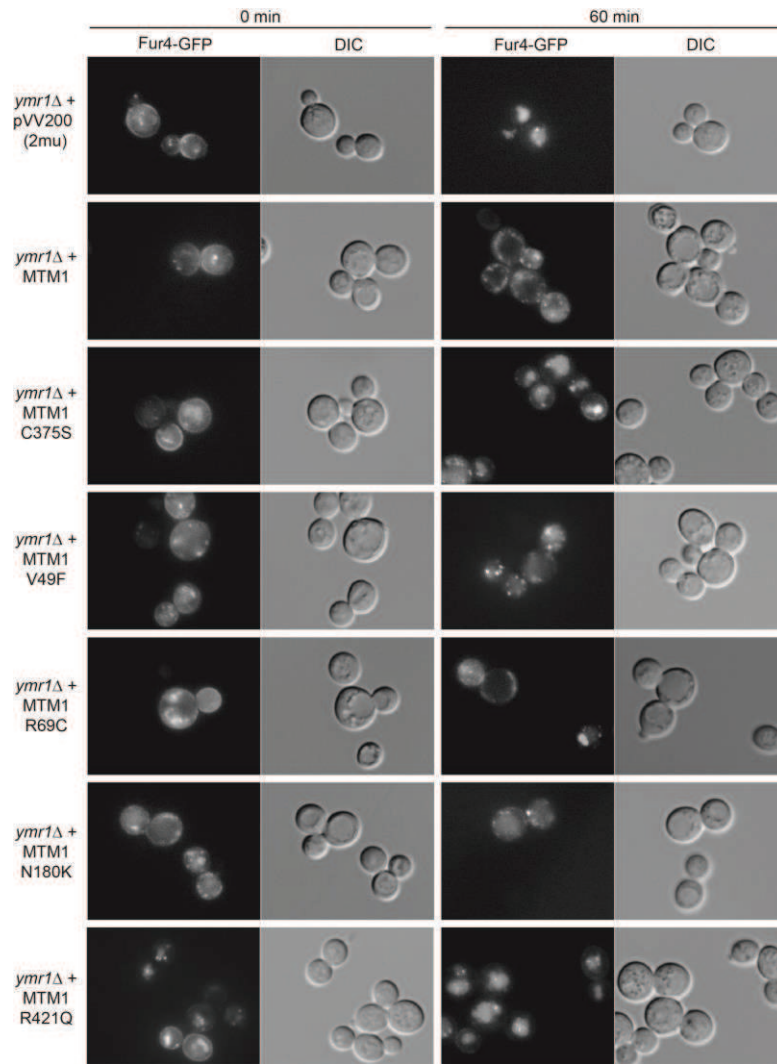
Pour cela, un plasmide portant le gène codant pour Fur4 en fusion avec la GFP et placé sous le contrôle du promoteur inductible Galactose est introduit dans des levures SEY6210 *ymr1Δ* cultivée en milieu raffinose (un sucre ne permettant pas l'activation du promoteur GAL). L'expression de Fur4-GFP à partir du plasmique est induite par ajout de galactose dans la culture. Après 90 minutes, on ajoute du glucose pour bloquer la néosynthèse de Fur4-GFP.

En condition normale de culture, Fur4-GFP est localisée à la membrane plasmique. En présence de cycloheximide, Fur4-GFP est internalisée, triée dans les MVB pour rejoindre le lumen de la vacuole.

L'analyse de Fur4-GFP montre que la protéine est normalement sécrétée à la membrane plasmique dans toutes les souches SEY6210 *ymr1Δ* testées, qu'elles produisent ou non une myotubularine, au temps 0 minutes avant ajout de cycloheximide dans le milieu de culture. Après 60 minutes d'internalisation, Fur4-GFP est détectée dans le lumen de la vacuole chez la levure transformée avec un plasmide vide. Les cellules produisant les formes inactives MTM1<sup>C375S</sup> et MTM1<sup>R421Q</sup> présente également une fluorescence normale dans le lumen de la vacuole après 60 minutes. En revanche, la production de myotubularines actives MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> montrent une accumulation de Fur4-GFP au niveau de structures ponctuées adjacentes à la vacuole. Les mutants MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>N180K</sup> affichent un phénotype intermédiaire, avec une fluorescence vacuolaire faible et quelques points à proximité de la membrane vacuolaire (Figure 65). Après des temps plus longs, la fluorescence est vacuolaire pour toutes les cellules.

## **DISCUSSION**

Ces résultats montrent que la surproduction de myotubularines MTM1 actives est responsable d'un retard dans le tri de cargos endocytiques, tel que Fur4-GFP, de manière similaire à ce qui avait été observé dans des mutants *fab1Δ* et dans des mutants thermo-sensibles *vp34-ts* (Shaw et al., 2003; Wurmser and Emr, 1998). Ces phénotypes sont dépendants de l'activité phosphatase des myotubularines, ce qui suggèrent une nouvelle fois qu'elles déphosphorylent un pool de PtdIns3P endosomal important pour le tri de protéines à destination vacuolaire passant par les compartiments endosomaux.



**Figure 65 : Analyse de la voie du trafic de l'uracile perméase Fur4-GFP dans *S. cerevisiae*.** Des cellules SEY6210 *ymr1Δ* transformées avec le plasmide pVV200 vide ou codant pour les différentes formes de MTM1 ont été cotransformées avec un vecteur d'expression de Fur4 fusionnée à la GFP et sous le contrôle d'un promoteur inducible *GALI*. Après 90 minutes d'induction de Fur4-GFP avec du galactose, la néosynthèse est stoppée par ajout de glucose. Au temps 0 minutes, avant ajout de cycloheximide, Fur4-GFP est normalement localisée à la membrane plasmique dans toutes les cellules. Après 60 minutes, les myotubularines actives présentent un retard de tri au niveau de structures ponctuées ressemblant aux endosomes.

#### 4. L'endocytose en phase fluide n'est pas affectée par MTM1

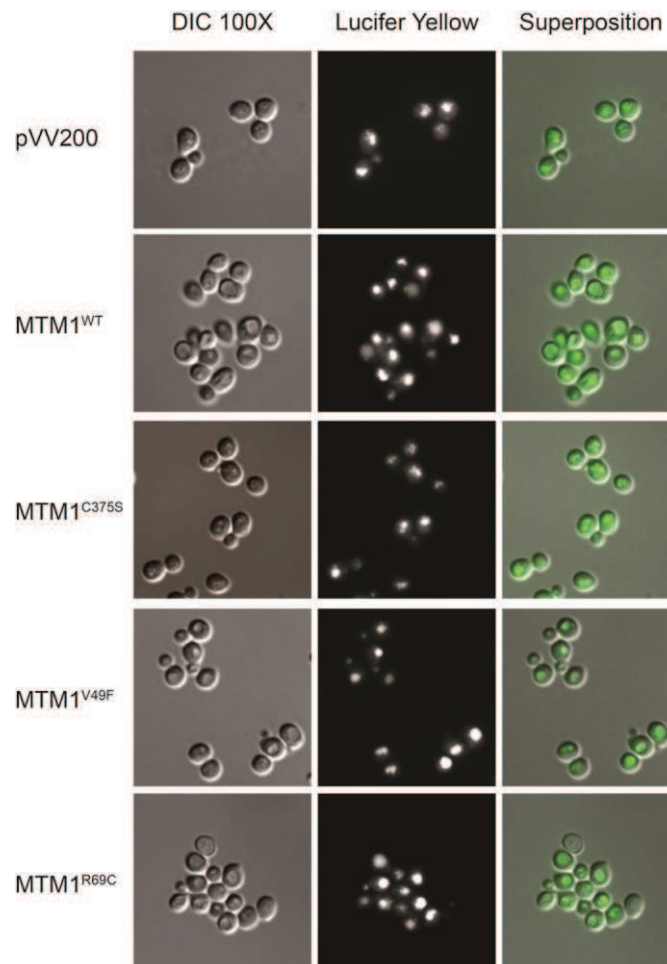
L'endocytose en phase fluide, c'est-à-dire non relayée par des récepteurs membranaires, peut être suivie par le biais d'un colorant fluorescent appelé Lucifer Yellow (LY) s'accumulant dans le lumen de la vacuole. Le LY est incapable de traverser les membranes biologiques et son accumulation dans la vacuole dépendra donc du transport vésiculaire. En condition normale, le colorant est internalisé non spécifiquement par endocytose en même temps qu'une invagination se forme. Le LY sera donc retrouvé dans le lumen des vésicules d'endocytose à destination de la

## Partie II : Résultats et Discussion - Effets de la surexpression de MTM1 dans *S. cerevisiae* sur diverses voies du trafic dépendants des PPIIn

vacuole. Pour cela, les cellules sont incubées environ 1h30 en présence de LY, à l'obscurité. Puis la réaction est stoppée par ajout d'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), lavées et observées par microscopie à fluorescence.

Afin de déterminer si la présence des myotuburines peut altérer le processus d'endocytose en phase fluide, j'ai analysé la fluorescence dans des souches SEY6210 *ymr1Δ* transformées soit avec un plasmide pVV200 vide ou codant pour les différentes myotubularines.

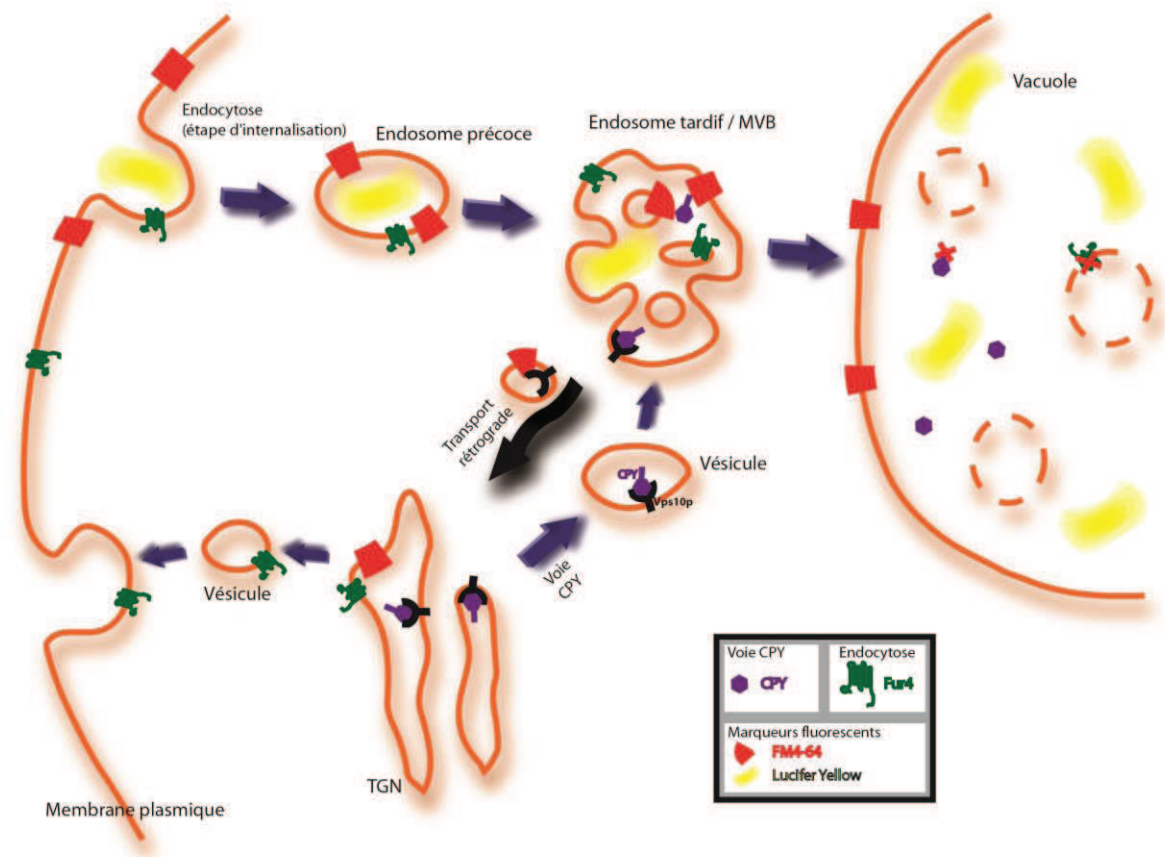
Chez la levure transformée avec le plasmide vide, la fluorescence est normalement localisée dans le lumen de la vacuole. En présence des myotubularines MTM1<sup>WT</sup>, MTM1<sup>C375S</sup>, MTM1<sup>V49F</sup> ou MTM1<sup>R69C</sup>, la même fluorescence vacuolaire a été observée en comparaison aux levures transformées avec le plasmide vide. L'unique différence réside dans la morphologie vacuolaire des souches produisant une myotubularine active (Figure 66).



**Figure 66 : Analyse de l'endocytose en phase fluide à l'aide du marqueur fluorescent Lucifer Yellow.** Le LY est un colorant fluorescent s'accumulant dans le lumen de la vacuole lorsque les cellules sont incubées avec ce marqueur. Le LY est incapable de traverser les membranes biologiques et son accumulation dans la vacuole dépendra donc du transport vésiculaire. La surexpression de MTM1<sup>WT</sup> ou des différents mutants n'altère pas le processus d'endocytose en phase fluide puisque le LY est correctement délivré dans le lumen de la vacuole, indépendamment de l'activité phosphatases de mutants MTM1.

**DISCUSSION**

L'absence de phénotype concernant l'endocytose en phase fluide, visualisée ici par l'internalisation du marqueur fluorescent Lucifer Yellow, suggèrent que les myotubularines actives ou inactives n'ont pas d'influence majeure sur cette voie cellulaire. Le matériel soluble extracellulaire peut être correctement délivré vers la vacuole pour dégradation malgré la surproduction de myotubularines enzymatiquement actives. Ceci montre donc que le défaut d'adressage de Fur4-GFP n'est pas du à un défaut de fusion des endosomes avec la vacuole, mais bien à une altération du tri protéique au niveau des endosomes tardifs (ou MVB), sachant que ce tri dépend du PtdIns3P et du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>.



**Figure 67 : Schéma récapitulatif des différents marqueurs utilisés dans cette étude.** En rouge, le FM4-64 est une colorant lipophile, marquant les membranes biologiques. Ajoutés au milieu de culture, il marque la mambrane plasmique puis est internalisé pour décorer la membrane de la vacuole en passant pas le système endosomal. En jaune , le Lucifer Yellow est un colorant incapable de traverser les membranes biologiques. De ce fait, il sera internalisé dans les vésicules d'endocytoses et marquera le lumen de la vacuole en fin de parcours. En violet, la protéine CPY (Carboxypeptidase Y) est une protéase synthétisée dans le réticulum endoplasmique. CPY subit des étapes successives de maturation dans l'appareil de Golgi puis dans le réticulum endoplasmique avant de rejoindre le lumen de la vacuole. En vert, l'uracile perméase Fur4 est une protéine transmembranaire sécrétée à partir de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique. En condition de stress, Fur4 est internalisée et est triée par le système endosomal pour être libérée dans le lumen de la vacuole.

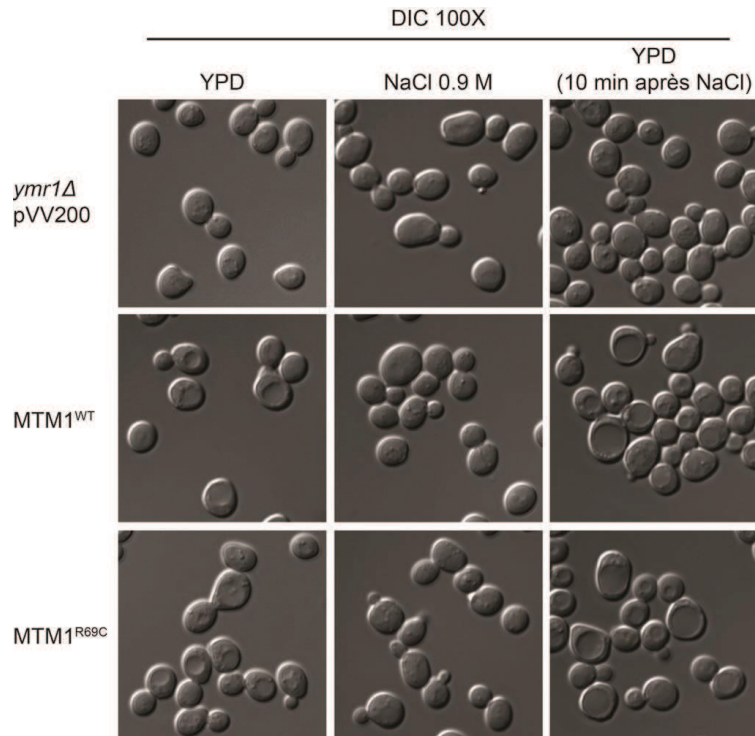
## **5. Récupération de la morphologie vacuolaire après un choc osmotique**

Le phénotype « large vacuole » est très prononcé lorsque des levures SEY6210 *ymr1Δ* produisent des formes actives de MTM1, telles que MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup>. Nous avons montré que ces deux myotubularines sont actives *in vivo* dans la levure (Figure 4 de l'article). MTM1<sup>R69C</sup> est cependant impliquée dans la XLCNM bien que son activité phosphatase ne soit pas affectée.

Suite à un stress hyperosmotique, les levures transformées avec un plasmide pVV200 vide présentent une vacuole fragmentée, résultant de l'activation de la kinase Fab1 générant le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>. L'élévation de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> est à l'origine de la fragmentation de la vacuole. De la même manière les levures produisant les formes MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup>, responsables d'un élargissement vacuolaire en milieu riche, affichent une vacuole fragmentée en condition de choc osmotique.

Dans cette expérience, j'ai cherché à déterminer la capacité de MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> à permettre la récupération des morphologies vacuolaires après un choc osmotique. Je souhaitais de cette manière identifier une possible différence d'activité sur un temps court. En effet, les dosages des PPIIn *in vivo* ou les dosages en masse ont été réalisés à partir de cellules en culture pendant plusieurs heures. Une différence très légère en terme d'activité phosphatase ou de recrutement, en condition de surproduction de MTM1, sur des temps longs, pourrait passer inaperçu. De plus, le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, après un choc osmotique, peut augmenter de plus de huit fois sa concentration en condition basale (Bonangelino et al., 2002). Cette augmentation massive pourrait permettre de détecter une différence entre MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> dans leur capacité à réduire le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> à des niveaux suffisamment faibles pour induire le phénotype « large vacuole ».

J'ai donc observé la morphologie vacuolaire des levures contrôles (plasmide vide), produisant MTM1<sup>WT</sup> ou MTM1<sup>R69C</sup> après un choc osmotique de 10 minutes en présence de 0.9M de NaCl. Comme attendu, les vacuoles des trois souches de levure sont fragmentées. Après lavage et transfert des cellules en milieu riche, les levures produisant les formes MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> montrent, après 10 minutes en milieu riche des vacuoles comparables à celles avant le choc osmotique (Figure 68).



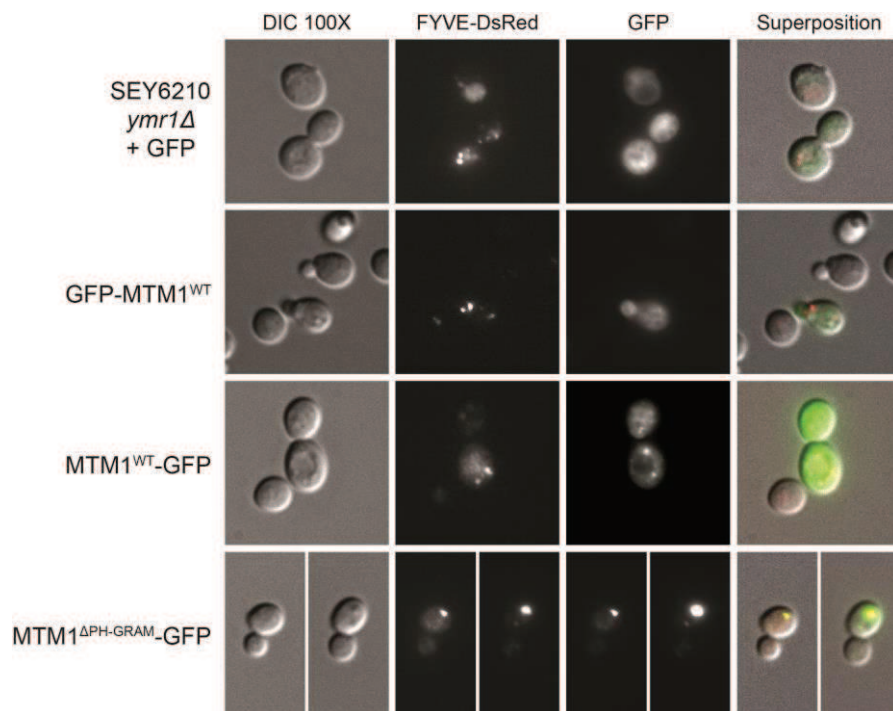
**Figure 68 : Récupération de la morphologie vacuolaire après un choc osmotique.** En milieu riche, les levures produisant des formes actives de MTM1 présentent des phénotypes « larges vacuoles » en corrélation avec l'activité phosphatase des myotubularines MTM1. En présence d'une forte concentration en NaCl (0.9 M pendant 10 minutes), les vacuoles sont fragmentées. Après lavages des cellules pour éliminer le NaCl, 10 minutes suffisent pour récupérer le phénotype « larges vacuoles ».

## **DISCUSSION**

Les capacités des myotubularines MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> à récupérer un phénotype « large vacuole » sont similaires 10 minutes après transfert d'un milieu NaCl vers un milieu riche. Néanmoins, au vue de la quantité et de la stabilité des myotubularines dans *S. cerevisiae*, il est possible que le recrutement des myotubularines au lieu où le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> est produit par Fab1 soit trop rapide pour voir une différence entre MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>R69C</sup>. Il serait peut-être plus judicieux de réaliser la même expérience en utilisant un plasmide pVV204 (centromérique, 1-3 copies par cellule) dans la mesure où ce plasmide permet la production des myotubularines en plus faible quantité.

## H. Localisation de MTM1 fusionnée à la GFP

Etant donné que les myotubularines MTM1, indépendamment des mutations présentes, sont distribuées dans les fractions membranaires dans *S. cerevisiae*, j'ai cloné MTM1<sup>WT</sup> en fusion avec la GFP (soit à l'extrémité N-terminale, soit à l'extrémité C-terminale). J'ai par la suite co-transformé des levures *ymr1Δ* avec d'une part les constructions de MTM1<sup>WT</sup> fusionnées à la GFP et d'autre part un plasmide codant pour la sonde FYVE-DsRed. Cette sonde est constituée du domaine FYVE de la protéine endosomale EEA1 (Early Endosome Antigen 1) liant le PtdIns3P en fusion avec le fluorophore DsRed. FYVE-DsRed permettra donc de visualiser les endosomes décorés par le PtdIns3P.

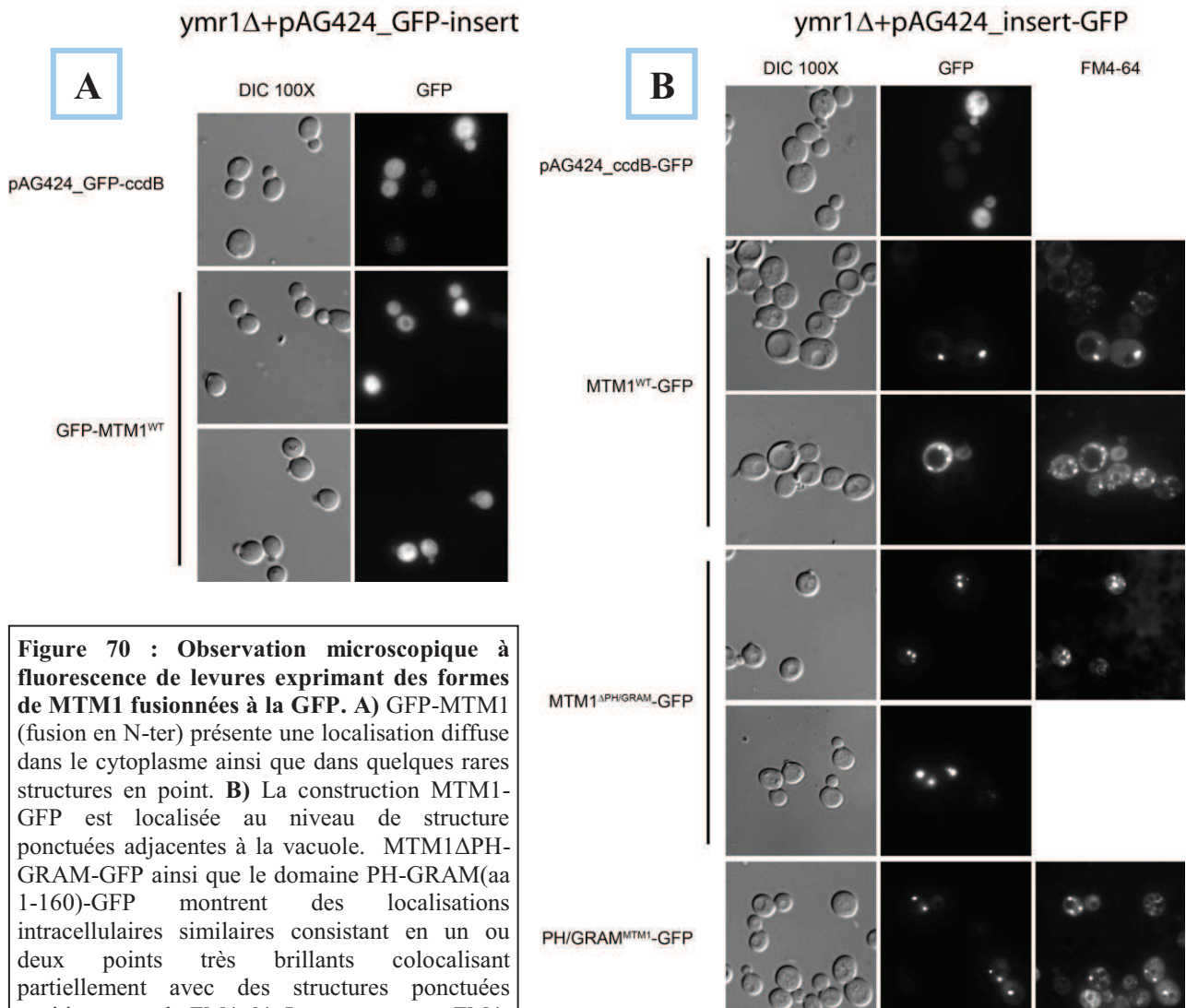


**Figure 69 : Observation microscopique de la localisation de MTM1 en fusion avec la GFP.** La myotubularine MTM1 a été fusionnée à la GFP à l'une et l'autre extrémité de la protéine. En addition, un mutant délété du domaine PH-GRAM (MTM1<sup>ΔPH-GRAM</sup>) a également été fusion en Cter à la GFP. GFP-MTM1 présente une fluorescence diffuse dans le cytoplasme tandis que la fusion Cterminale localise la protéine MTM-GFP au niveau de structures ponctuelles colocalisant partiellement avec la sonde FYVE-DsRed. Le mutant MTM1<sup>ΔPH-GRAM</sup>-GFP présente une localisation en un point unique très brillant.

L'observation microscopique à fluorescence, montre une fluorescence cytoplasmique diffuse pour les cellules transformées avec le plasmide sans insert tandis que la sonde FYVE-DsRed marque des structures ponctuelles correspondant aux endosomes dans les cellules présentées Figure 69.

La construction GFP-MTM1<sup>WT</sup> (fusion en N-ter) présente essentiellement une fluorescence diffuse dans le cytoplasme même si quelques rares structures ponctuées ont été observés (Figure 70A). De manière intéressante, la construction MTM1 fusionnée à la GFP à son extrémité C-terminale, présente une fluorescence cytoplasmique beaucoup plus faible et est localisée au niveau de points adjacents à la vacuole, colocalisant partiellement avec la sonde FYVE-DsRed (Figure 69) et le FM4-64 (Figure 70B).

Enfin, la construction MTM1<sup>ΔPH-GRAM</sup> déletée pour les 160 premiers acides aminés correspondant au domaine PH-GRAM, et fusionnée en C-ter à la GFP est très souvent localisée au niveau d'un point unique (parfois deux) très brillant dans la cellule (Figure 70B) et colocalise avec la sonde FYVE-DsRed (Figure 69).

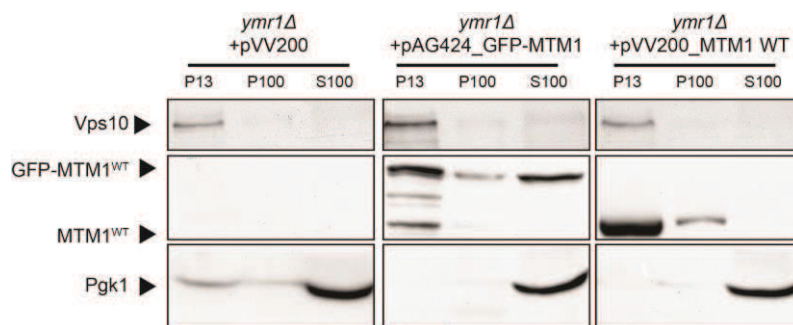


**Figure 70 : Observation microscopique à fluorescence de levures exprimant des formes de MTM1 fusionnées à la GFP. A)** GFP-MTM1 (fusion en N-ter) présente une localisation diffuse dans le cytoplasme ainsi que dans quelques rares structures en point. **B)** La construction MTM1-GFP est localisée au niveau de structure ponctuées adjacentes à la vacuole. MTM1<sup>ΔPH-GRAM</sup>-GFP ainsi que le domaine PH-GRAM(aa 1-160)-GFP montrent des localisations intracellulaires similaires consistant en un ou deux points très brillants colocalisant partiellement avec des structures ponctuées positives pour le FM4-64. Le marquage au FM4-64 a été réalisé pendant un temps court afin de mieux visualiser les structures endosomales.



J'ai par ailleurs analysé la localisation, en fusion GFP C-ter, du domaine PH-GRAM de MTM1<sup>WT</sup>. La fluorescence est localisée au niveau de structures en point colocalisant partiellement avec le FM4-64 (Figure 70B). A noter que pour cette observation microscopique, j'ai réalisé un marquage au FM4-64 très court (5 minutes) afin de visualiser les compartiments endosomaux (Figure 70B). En effet, à des temps plus longs, la fluorescence du FM4-64 est entièrement internalisée et ne marque que la membrane vacuolaire.

La fluorescence cytoplasmique diffuse de la construction GFP-MTM1<sup>WT</sup> (fusion en N-ter) ne corrèle pas avec la distribution membranaire de la protéine MTM1<sup>WT</sup> non-étiquetée dans mes analyses par fractionnement subcellulaire. J'ai donc vérifié la distribution de la construction GFP-MTM1<sup>WT</sup> en fractionnement subcellulaire. Les résultats montrent que dans les mêmes conditions, MTM1<sup>WT</sup> non-étiquetée est bien distribuée dans les fractions membranaires tandis qu'un important pool de GFP-MTM1<sup>WT</sup> est présent dans la fraction cytosolique S100.



**Figure 71 : Fractionnement subcellulaire d'extraits protéiques de levures produisant GFP-MTM1 et MTM1 non étiquetée.** MTM1<sup>WT</sup> non-étiquetée est distribuée dans les fractions P13 et P100, comme décrit plusieurs fois dans ce manuscrit. En revanche la construction GFP-MTM1<sup>WT</sup> est partagée entre la fraction P13 et la fraction cytosolique S100.

## DISCUSSION

Ces résultats montrent que la présence d'une étiquette GFP en fusion N-terminale avec MTM1<sup>WT</sup> (GFP-MTM1<sup>WT</sup>) induit une relocalisation de la protéine de fusion dans la fraction cytoplasmique. Cette observation est confirmée d'une part par la fluorescence diffuse en microscopie et d'autre part par fractionnement subcellulaire. En effet, alors que la protéine non-étiquetée est distribuée dans les fractions membranaires, une proportion significative de GFP-MTM1 est détectée dans la fraction cytoplasmique S100.

De manière intéressante, la proportion de MTM1 détectée dans la fraction P100 est relativement inchangée entre la protéine non-étiquetée et GFP-MTM1<sup>WT</sup>. Il est donc possible que la présence d'une étiquette GFP relocalise spécifiquement un sous-groupe de MTM1 de la fraction P13 vers le cytosol.

Il est également important de souligner que les phénotypes vacuolaires sont distincts entre les levures produisant GFP-MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>WT</sup>-GFP. En effet, les cellules produisant la myotubularine fusionnée à la GFP C-terminale présentent une proportion de larges vacuoles plus élevée que celle observée chez les levures produisant GFP-MTM1<sup>WT</sup>. Ceci suggère que la fusion GFP en N-ter perturbe l'activité phosphatase de MTM1<sup>WT</sup>, probablement en raison de sa relocalisation dans le cytoplasme, où la protéine GFP-MTM1<sup>WT</sup> n'est pas en contact avec ses substrats lipidiques, le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>.

Le dernier point concerne les myotuburines MTM1 tronquées fusionnées en C-ter à la GFP. La localisation de ces deux constructions (MTM1<sup>ΔPH-GRAM</sup>-GFP et PH-GRAM<sup>MTM1</sup>-GFP) présente d'inexplicables similarités. En effet, l'absence du domaine PH-GRAM induit une fluorescence forte au niveau de structures ponctuées colocalisant partiellement avec des marqueurs endosomaux (FYVE-DsRed et FM4-64) suggérant que le domaine PH-GRAM est facultatif pour localiser MTM1 aux endosomes. Cette observation est surprenante dans la mesure où le domaine PH-GRAM a été identifié comme étant impliqué dans la liaison avec les substrats de la myotubularine.

D'un autre côté, le domaine PH-GRAM seul (acides aminés 1 à 160) affiche une fluorescence similaire au niveau de compartiments colocalisant partiellement avec des marqueurs endosomaux. Ces résultats suggèrent donc que l'adressage endosomal de MTM1 dépend de deux domaines qui s'auto-suffisent : le PH-GRAM et le domaine catalytique, sachant que ces deux domaines sont capables de lier les PPI in vitro.

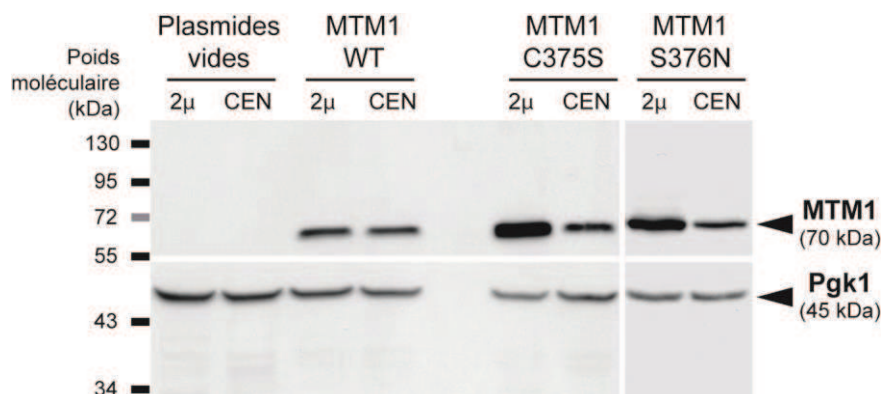
En d'autres mots, ces observations envoient trois messages difficiles à connecter : 1) le domaine PH-GRAM seul est suffisant pour la localisation endosomale, 2) le domaine PH-GRAM n'est pas indispensable pour la localisation endosomale de MTM1<sup>ΔPH-GRAM</sup> et 3) un possible encombrement stérique par la GFP proche du domaine PH-GRAM induit la relocalisation d'une partie de GFP-MTM1<sup>WT</sup> dans le cytoplasme.

Pour conclure, des analyses complémentaires seront nécessaires pour mettre au clair l'implication du domaine PH-GRAM dans la localisation de MTM1<sup>WT</sup>. Il serait notamment judicieux d'identifier avec plus de précision les compartiments dans lesquels ces myotubularines s'accumulent.

## I. Analyse du mutant S376N

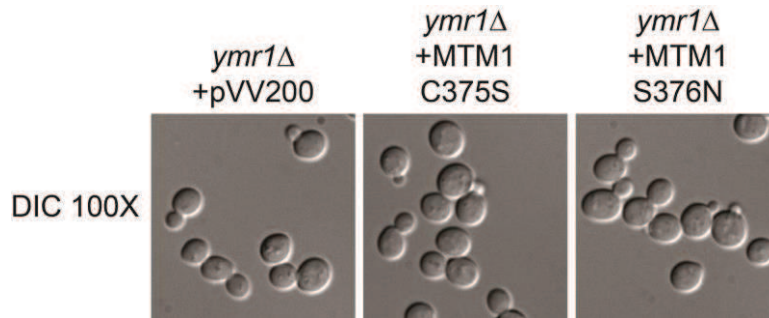
Le mutant MTM1<sup>S376N</sup> de myotubularine a été analysé suite à l'hypothèse d'un possible effet « substrat-trap » du mutant MTM1<sup>C375S</sup>. Le mutant MTM1<sup>S376N</sup> a été caractérisé comme étant catalytiquement inactif et la mutation de la Sérine en position 376 en une Asparagine génère un encombrement stérique dans la poche catalytique rendant peu probable la possibilité de piéger les substrats (Figure S5 de l'article).

J'ai par conséquent réalisé les mêmes analyses à partir de MTM1<sup>S376N</sup> que celles réalisées pour les autres myotubularines. Les levures SEY6210 *ymr1Δ* ont été transformées soit avec un plasmide pVV200\_MTM1<sup>S376N</sup> soit avec un plasmide pVV204\_MTM1<sup>S376N</sup>. Les niveaux de production de la protéine dans *S. cerevisiae* sont comparables à ceux des mutants inactifs MTM1<sup>C375S</sup> et MTM1<sup>R421Q</sup>. Cette observation est en adéquation avec le fait que les myotubularines enzymatiquement inactives sont produites en plus grandes quantité dans la levure que les myotubularines actives.



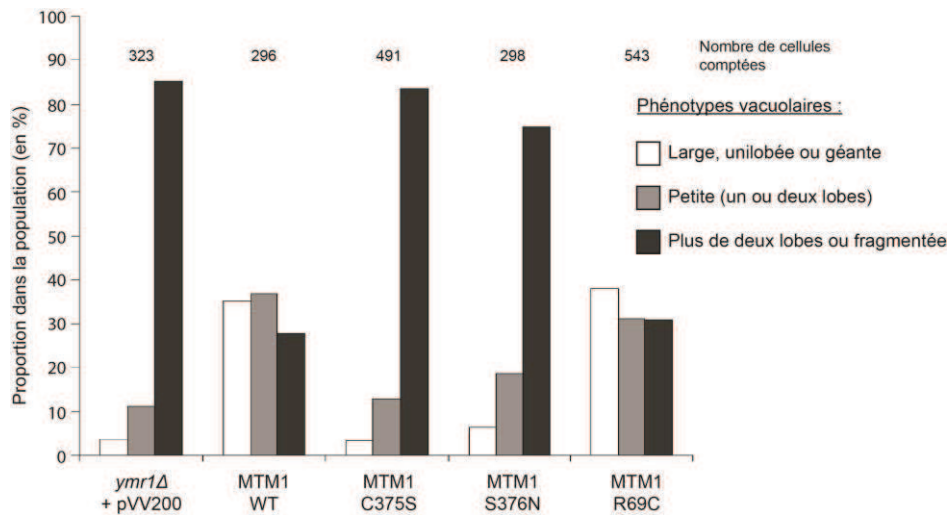
**Figure 72 : Analyse de la production de différentes formes de MTM1 dans *S. cerevisiae* SEY6210 *ymr1Δ*.** Les gènes codant pour les différentes formes de MTM1 ont été placés sous le contrôle d'un promoteur repressible à la tétracycline *TetO* dans le plasmide centromérique CEN (pVV204, 1-3 copies par cellule). Dans le plasmide épisomique à haut nombre de copies, *MTM1* a été placé sous le contrôle d'un promoteur fort *PGK1* (2μ). Les protéines MTM1 ont été détectées à l'aide d'anticorps anti-MTM1 1G6. Les protéines sont produites à la taille attendue (70kDa). La protéine Pgk1, la phosphoglycérate kinase de levure, sert ici de contrôle de charge.

En microscopie, la surproduction de MTM1<sup>S376N</sup> n'induit pas d'élargissement vacuolaire et les levures produisant MTM1<sup>S376N</sup> présentent des phénotypes comparables aux levures produisant les mutants inactifs MTM1<sup>C375S</sup> et MTM1<sup>R421Q</sup>.



**Figure 73 : Phénotypes vacuolaires des levures produisant MTM1<sup>S376N</sup>.** Les phénotypes des levures produisant MTM1<sup>S376N</sup> sont comparables à ceux des levures produisant les formes inactives de myotubularines MTM1<sup>C375S</sup> et MTM1<sup>R421Q</sup>.

L'analyse des phénotypes sur une population de près de 300 cellules montre que les phénotypes des levures produisant le mutant MTM1<sup>S376N</sup> sont comparables à ceux des levures transformées avec le plasmide vide ou produisant les mutants MTM1<sup>C375S</sup> et MTM1<sup>R421Q</sup> (Figure 74)



**Figure 74 : Quantification des morphologies vacuolaires des levures produisant le mutant MTM1<sup>S376N</sup>.** La classification en trois catégories des phénotypes vacuolaires montrent que les levures produisant le mutant MTM1<sup>S376N</sup> présentent des morphologies vacuolaires comparables à celles des levures transformées avec le plasmide vide ou produisant les formes inactives de myotubularines MTM1<sup>C375S</sup> et MTM1<sup>R421Q</sup>.

## DISCUSSION

Mes résultats montrent que la surexpression d'un mutant MTM1<sup>S376N</sup> est à l'origine de phénotypes vacuolaires similaires à ceux observés dans le cas de la surexpression d'une myotubularine inactive MTM1<sup>C375S</sup>. De plus, ses niveaux de production dans *S. cerevisiae* sont plus élevés que dans le cas d'une myotubularine active. Toutes ces données suggèrent que MTM1<sup>S376N</sup> est un mutant catalytique inactif. Des prédictions de structures montrent en effet qu'il est peu probable que ce mutant puisse accommoder les substrats lipidiques dans sa poche catalytique en raison d'un encombrement stérique lié au résidu Asparagine remplaçant une Sérine.

## II. Coexpression MTM1 / MTMR12

Dans les cellules de mammifères, différents couples de myotubularines peuvent se former (Laporte et al., 2003; Lorenzo et al., 2006; Robinson and Dixon, 2005). Ces interactions entre myotubularines vont permettre de stimuler l'activité PPIIn 3-phosphatase du partenaire actif mais également de relocaliser certains complexes hétérodimériques dans des compartiments distincts des homodimères (Berger et al., 2006; Kim et al., 2003; Laporte et al., 2003; Mochizuki and Majerus, 2003; Nandurkar et al., 2003; Robinson and Dixon, 2005; Zou et al., 2009).

Chez l'Homme, MTM1 est capable de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser avec MTMR12 un myotubularine inactive (Nandurkar et al., 2003). Des interactions entre MTM1 et MTMR10 ont également été rapporté dans des expériences de co-immunoprécipitation et de double-hybride (Lorenzo et al., 2005). Les dernières données concernant le réseau d'interaction entre myotubularines montrent qu'il est relativement complexe. En exemple, MTMR2 est capable non seulement de s'homodimériser mais également de s'associer aux myotubularines MTMR5, MTMR10, MTMR12 et MTMR13 tandis que MTMR9 peut se lier à elle-même, MTMR6, MTMR7 et MTMR8. Les différentes interactions identifiées sont représentées dans la Figure 41.

Dans les cellules de mammifères il est donc difficile d'analyser la fonction d'un couple spécifique de myotubularines étant donné qu'une myotubularine donnée peut s'associer avec plusieurs partenaires. La levure présente ici un avantage évident : il est possible de co-exprimer deux myotubularines dans un système eucaryote et d'analyser spécifiquement l'effet de l'interaction entre ces deux myotubularines.

### A. Phénotypes en coexpression

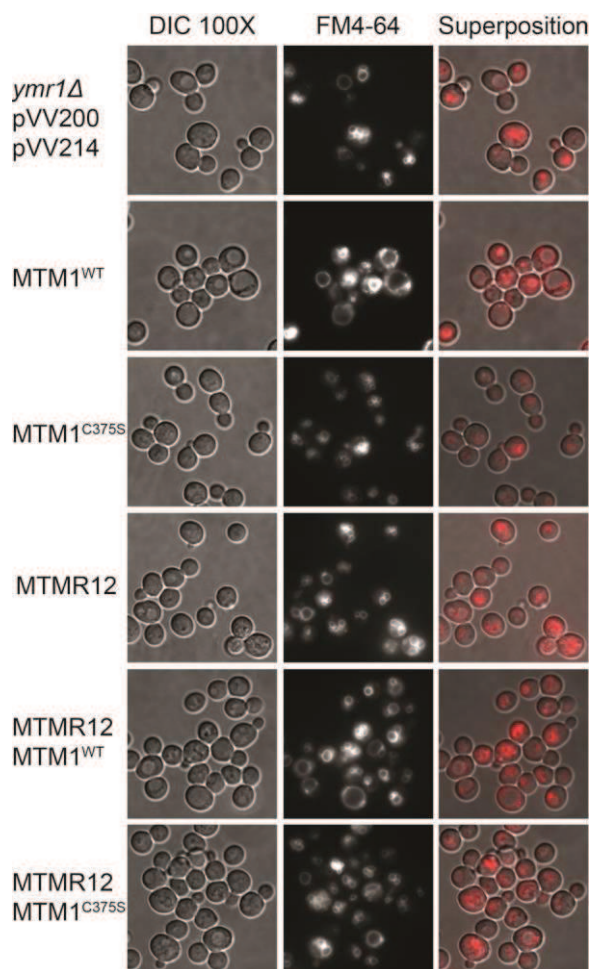
J'ai co-transformé des levures SEY6210 *ymr1Δ* avec un plasmide pVV214 codant pour MTM1<sup>WT</sup> ou MTM1<sup>C375S</sup> et un second plasmide pVV214 codant pour MTMR12. Les cellules co-exprimant MTM1 et MTMR12 ont été observées au microscope après un marquage de la membrane vacuolaire au FM4-64 afin de mieux visualiser d'éventuels changements de la morphologie vacuolaire.

Les observations microscopiques montrent que la co-expression des deux plasmides vides n'a pas d'effet sur la morphologie vacuolaire en comparaison à une levure SEY6210 *ymr1Δ* non transformée. La production de MTM1<sup>WT</sup> seule induit un élargissement vacuolaire similaire à ce qui a été observé précédemment tandis que le mutant inactif présente des vacuoles légèrement fragmentées similaires aux levures *ymr1Δ* non transformées.

La production de MTMR12 seule, n'induit aucun changement de la morphologie vacuolaire en comparaison à une levure co-exprimant les deux plasmides vides, en accord avec le fait que cette myotubularine soit enzymatiquement inactive.

La co-expression de MTM1 avec MTMR12 provoque une augmentation du volume vacuolaire comparable à celle observée pour l'expression de MTM1<sup>WT</sup> seule.

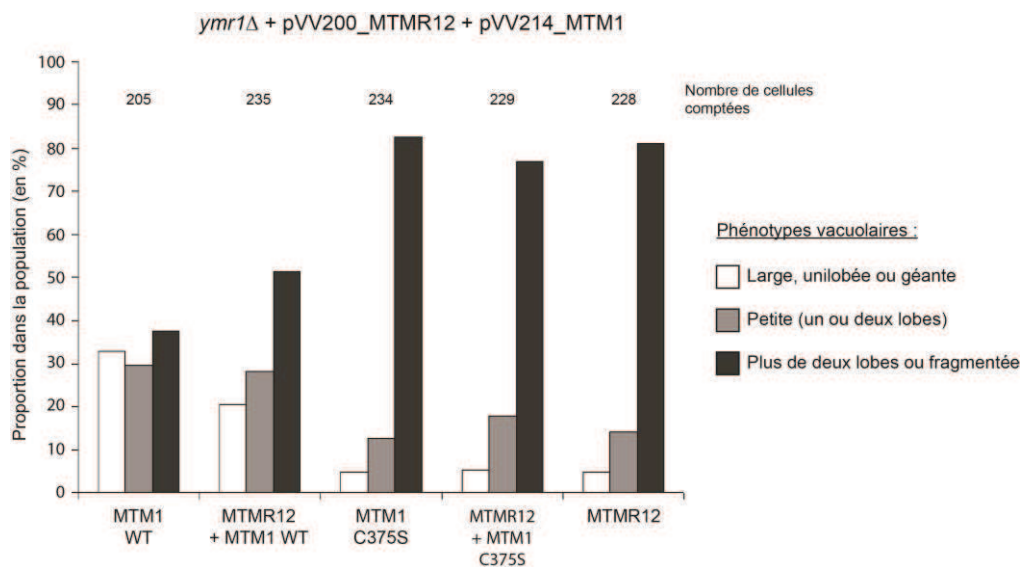
Enfin, la co-expression de MTM1<sup>C375S</sup> avec MTMR12 n'induit pas de changements significatifs dans la morphologie vacuolaire des cellules produisant ces deux myotubularines inactives (Figure 75).



**Figure 75 : Observation microscopique de levure co-exprimant MTM1 et MTMR12.** Phénotypes de cellules SEY6210 *ymr1Δ* co-exprimant MTM1<sup>WT</sup> ou MTM1<sup>C375S</sup> et MTMR12. Les myotubularines sont produites à partir de plasmides de surexpression pVV200 (MTMR12) et pV214 (MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>C375S</sup>). Les cellules ont été marquées pendant 15 minutes avec du FM4-64, un colorant lipophile permettant de visualiser la membrane vacuolaire. Les cellules produisant MTM1<sup>WT</sup>, en combinaison ou non avec MTMR12, présentent un élargissement vacuolaire similaire à la surexpression de MTM1 seul. MTMR12 ou MTMR12 en combinaison avec MTM1<sup>C375S</sup> affichent des morphologies vacuolaires comparables à celles observées chez les cellules transformées avec les deux plasmides vides.

Une analyse quantitative des morphologies vacuolaires confirme les observations microscopiques initiales. En effet, un élargissement vacuolaire n'est induit que lorsque les cellules produisent une myotubularine MTM1<sup>WT</sup> active. MTMR12 seule ou la coexpression de MTMR12 avec une myotubularine inactive MTM1<sup>C375S</sup> n'a pas d'effet visible sur le volume vacuolaire.

Cependant, il apparaît que la co-expression de MTM1 avec MTMR12 semble diminuer la proportion de vacuoles larges unilobées ou géantes en comparaison à l'expression de MTM1<sup>WT</sup> seule. En effet, la présence de MTM1 seule conduit à la formation de plus de 30% de vacuoles larges ou géantes et environ 38% de vacuoles normales (en comparaison à la souche *ymr1Δ*). La présence de MTMR12 en combinaison à MTM1<sup>WT</sup> réduit la proportion de larges vacuoles à 20% pour environ 50% de vacuoles normales.



**Figure 76 : Quantification des morphologies vacuolaires de levures co-exprimant MTM1 et MTMR12.** La classification en trois catégories des phénotypes vacuolaires montrent que seules les levures produisant une myotubularine active présentent un élargissement vacuolaire. La surexpression de MTMR12 seule n'a pas d'effet notable sur le volume vacuolaire. La co-expression de MTM1 avec MTMR12 semble réduire la proportion de cellules présentant de larges vacuoles.

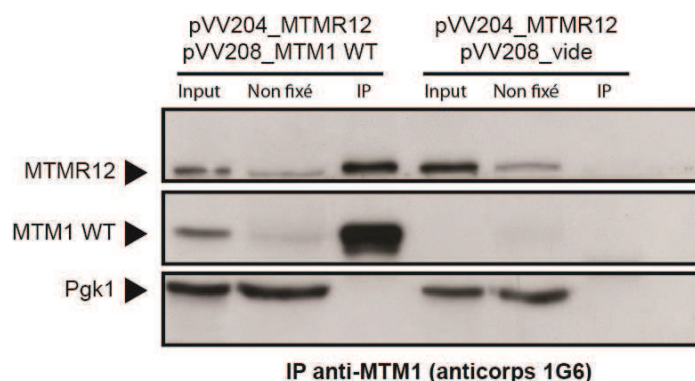
## DISCUSSION

L'observation des phénotypes vacuolaires en co-exprimant MTM1 avec MTMR12 suggère que l'association de MTM1 avec MTMR12 a un effet de régulation négatif modéré dans *S. cerevisiae*. Ceci est surprenant dans la mesure où il avait été montré que la formation de l'hétérodimère MTM1/MTMR12 avait un effet stimulateur sur l'activité phosphatase (Nandurkar et al., 2001; Nandurkar et al., 2003). La confirmation de cette tendance nécessitera sans doute de renouveler les quantifications sur plusieurs cultures indépendantes et un panel de cellules plus important (au moins 500 cellules).

Dans l'hypothèse où les légères différences dans les morphologies vacuolaires entre l'expression de MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>WT</sup>/MTMR12 ne serait pas significative, je ne peux pas exclure que l'association de ces deux myotubularines est effectivement favorable à une augmentation de l'activité enzymatique. En effet, MTM1<sup>WT</sup>, à partir du plasmide pVV200, est produite en abondance dans *S. cerevisiae*, dans des quantités probablement non physiologiques. Par conséquent, il est probable que l'activité de MTM1<sup>WT</sup> soit suffisante à elle seule pour générer un phénotype « large vacuole » maximal par déphosphorylation de l'essentiel des substrats de MTM1<sup>WT</sup>. Ainsi, en combinaison avec MTMR12, son activité pourrait donc être stimulée sans que cela ne se reflète dans le phénotype vacuolaire puisque cela reviendrait à déphosphoryler le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> pour les amener à des niveaux équivalents à ceux présents lorsque MTM1 est produite seule.

## B. MTM1 et MTMR12 interagissent dans *S. cerevisiae*

S'il a été montré que MTM1 et MTMR12 interagissent *in vivo* dans les cellules humaines, je me devais de confirmer cette interaction dans la levure. Afin d'écarter la possibilité que ces deux protéines puissent ne pas interagir dans *S. cerevisiae*, j'ai réalisé une co-immunoprécipitation à partir d'extraits protéiques de levures *ymr1Δ* co-exprimant MTM1<sup>WT</sup> et MTMR12 ou MTMR12 seule. Les extraits protéiques ont été incubés avec des billes de sépharose sur lesquelles l'anticorps anti-MTM1 monoclonal 1G6 a préalablement été fixé. Après incubation une nuit à 4°C sur roue, les billes sont lavées et analysées par WB à l'aide d'anticorps anti-MTMR12 (un don de Harshal Nandurkar), anti-MTM1 1G6 et anti-Pgk1.



**Figure 77 : Co-immunoprécipitation de MTM1 et MTMR12 dans *S. cerevisiae*.** MTM1 et MTMR12 interagissent dans la levure. En effet, l'immunoprécipitation de MTM1 permet de coprécipiter MTMR12 tandis qu'en absence de MTM1, MTMR12 n'est pas retrouvé dans la fraction purifiée (IP). Les fractions non fixées correspondent au surnageant après incubation avec les billes. Input désigne l'extrait protéique total ajouté aux billes.



## **Partie II : Résultats et Discussion - MTM1 et MTMR12 cofractionnent lors d'un fractionnement subcellulaire**

L'immunoprécipitation de MTM1 à partir d'anticorps anti-MTM1 1G6 fixés sur des bille de sépharose permet la détection de MTM1 dans la fraction purifiée. De plus, lorsque MTM1 est présente, la grande majorité de MTMR12 coprécipite avec MTM1 dans la fraction IP (Figure 77). A l'inverse, des extraits protéiques totaux de levures produisant MTMR12 seule et incubés avec des anticorps anti-MTM1 ne permettent pas de détecter MTMR12 dans la fraction purifiée.

### **DISCUSSION**

Ces résultats confirment l'interaction entre MTM1 et MTMR12 dans la levure *S. cerevisiae*. Il est donc probable que les phénotypes « larges vacuoles » observés au microscope lors de la co-expression soient bien le fait de l'activité phosphatase du complexe MTM1/MTMR12. Cependant, je n'ai pas pu mettre en évidence de phénotype caractéristique de ce complexe étant donné que les phénotypes sont en tous points similaires à ceux de levures exprimant MTM1<sup>WT</sup>.

Néanmoins, ces résultats offrent de bonnes perspectives quant à l'analyse des effets de la coexpression de deux myotubularines dans *S. cerevisiae*. En effet, en utilisant la levure, on peut envisager de co-exprimer un grand nombre de d'hétérodimères de myotubularines afin d'analyser les fonctions spécifiques de l'un ou l'autre complexe ainsi que leurs activités phosphatases. Par exemple, il serait possible de comparer les effets de l'association MTMR2/MTMR13 au niveau cellulaire et les comparer à ceux observés pour le couple MTMR2/MTMR5.

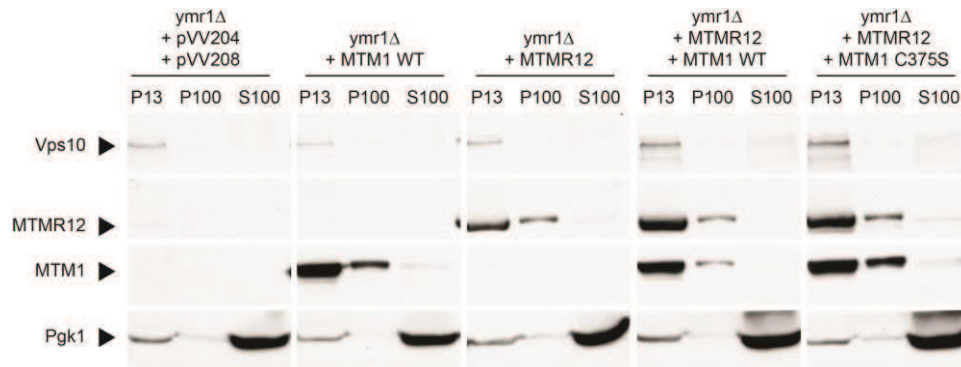
On pourrait aussi envisager de moduler la stoechiométrie des myotubularines en co-expression en utilisant des vecteurs d'expression plus ou moins forts afin de déterminer les préférences entre homodimérisation et hétérodimérisation.

### **C. MTM1 et MTMR12 cofractionnent lors d'un fractionnement subcellulaire**

Nous avons vu que MTM1 et MTMR12 interagissent dans *S. cerevisiae* et que les cellules présentent un phénotype « large vacuole » similaire à celui observé dans les levures produisant MTM1<sup>WT</sup>. Par ailleurs, dans des expériences de fractionnements subcellulaires, MTM1 est quasi-exclusivement distribuée dans les fractions membranaires P13 et P100 de manière indépendante du PtdIns3P et du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> et de diverses enzymes du métabolisme des PPIIn.

## Partie II : Résultats et Discussion - MTM1 et MTMR12 cofractionnent lors d'un fractionnement subcellulaire

Je me suis donc posé la question de savoir si l'interaction de MTM1 avec MTMR12 était à l'origine d'une relocalisation, au moins partielle, de MTM1 dans *S. cerevisiae*. Pour cela, j'ai réalisé un nouveau fractionnement subcellulaire à partir de levures produisant les deux myotubularines dans un contexte de production modérée (plasmides pVV204 et pVV208).



**Figure 78 : Fractionnement subcellulaire d'extrait protéiques de levures *ymr1Δ* co-exprimant *MTM1* et *MTMR12*.** Les extraits protéiques de levures exprimant  $MTM1^{WT}$  ou *MTMR12* ou coexprimant  $MTM1^{WT}/MTMR12$  et  $MTM1^{C375S}/MTMR12$  ont été soumis à un fractionnement subcellulaire. *MTM1* est principalement retrouvé dans les fractions membranaires P13 et P100. *MTMR12* est également présent dans les fractions P13 et P100 lorsqu'elle est produite seule. La présence de  $MTM1^{WT}$  en combinaison à *MTMR12* et de  $MTM1^{C375S}$  associée à *MTMR12* ne modifie pas le profil de distribution des protéines en comparaison des profils des protéines *MTM1* et *MTMR12* produites seules. *Vps10*, le récepteur de CPY est correctement distribué dans la fraction P13 et la phosphoglycérate kinase *Pgk1* dans la fraction soluble S100.

Nous avons vu que la distribution de  $MTM1^{WT}$  en fractionnement subcellulaire est essentiellement associée aux fractions membranaires P13 et P100 ; cette observation est retrouvée ici. *MTMR12* produite seule dans *S. cerevisiae* présente également une distribution membranaire (P13 et P100) de manière similaire à *MTM1*.

La co-production de  $MTM1^{WT}$  avec *MTMR12* ou de  $MTM1^{C375S}$  avec *MTMR12* ne modifie pas la distribution des hétérodimères en comparaison aux monomères/homodimères de *MTM1* ou de *MTMR12* (Figure 78).

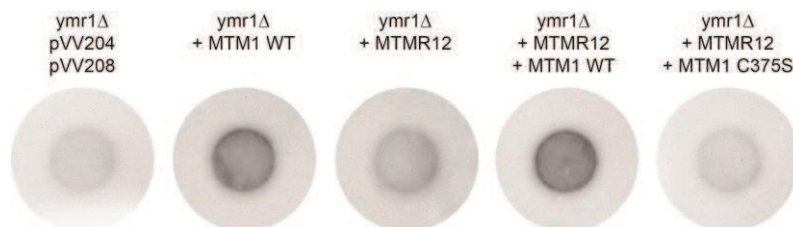
### DISCUSSION

Il a été suggéré que *MTMR12* joue un rôle de protéine adaptatrice de *MTM1* dans la mesure où leur interaction est capable de relocaliser *MTM1* de renflements de la membrane plasmique vers le cytoplasme. Dans *S. cerevisiae*, la coproduction de *MTM1* avec *MTMR12* ne modifie pas la localisation du complexe en comparaison aux deux protéines produites seules. Par conséquent leur interaction, dans *S. cerevisiae*, ne relocalise pas le complexe, ou du moins, ne relocalise pas le complexe des fractions membranaires vers le cytoplasme.

#### D. La co-expression de MTM1/MTMR12 induit la sécrétion de CPY

J'ai pu montrer précédemment que les levures produisant une forme active de myotubularine ont un défaut de tri au niveau des endosomes induisant la sécrétion de CPY dans le milieu extracellulaire.

J'ai réalisé la même analyse dans un contexte de co-expression de MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>C375S</sup> en combinaison avec MTMR12. Mes résultats montrent que la présence de MTM1<sup>WT</sup> en combinaison avec MTMR12 induit également la sécrétion de CPY dans le milieu extracellulaire. En revanche, la CPY n'est pas sécrétée lorsque MTMR12 est co-produite avec le mutant catalytique inactif MTM1<sup>C375S</sup> ou lorsque MTMR12 est produite seule (Figure 79).



**Figure 79 : Analyse de la sécrétion de CPY dans des levures co-exprimant *MTM1* et *MTMR12*.** Les levures SEY6210 *ymr1Δ* ont été déposées en goutte, incubées 72h en contact avec une membrane de nitrocellulose. Puis la membrane est lavée pour éliminer les cellules attachées et la CPY est immunodétectée à la manière d'un Western Blot classique avec un anticorps anti-CPY. Les levures produisant une forme enzymatiquement active de MTM1<sup>WT</sup> présentent une importante sécrétion de CPY dans le milieu extracellulaire. La co-expression de MTM1<sup>WT</sup> avec MTMR12 induit également la sécrétion de CPY à des niveaux comparables aux cellules produisant MTM1<sup>WT</sup>. Les immunodétections de CPY représentées ci-dessus proviennent de la même membrane et représentent donc des temps d'exposition identique. Aucun traitement d'image n'a été réalisé.

## DISCUSSION

En corrélation avec les phénotypes vacuolaires, l'interaction MTM1<sup>WT</sup>/MTMR12 résulte en la sécrétion de CPY, de manière similaire à ce qui est observé pour les levures produisant MTM1<sup>WT</sup> seule. Cette analyse montre une nouvelle fois que l'hétérodimère MTM1/MTMR12 est actif dans *S. cerevisiae*. Néanmoins, je n'ai pas pu identifier de différences notables entre les levures produisant MTM1<sup>WT</sup> seules et celles produisant MTM1<sup>WT</sup>/MTMR12. Il est probable que cette interaction ait un rôle physiologique dans les cellules de mammifère où 14 myotubularines « cohabitent » mais que cette fonction spécifique du couple MTM1/MTMR12 ne soit pas conservée dans la levure qui ne possède qu'un seul homologue de myotubularine, Ymr1. Malgré tout, j'ai pu montrer que MTM1 et MTMR12 interagissent dans *S. cerevisiae* et que l'hétérodimère est au moins aussi actif que MTM1 seule dans la levure.

### **III. MTMR2**

La deuxième partie de mon projet a consisté à identifier les différences entre la myotubularine MTM1 et son paralogue MTMR2. Il a été montré que ces deux enzymes ont conservé la même spécificité de substrat à l'encontre du PtdIns3P et du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> et que leur activité enzymatique *in vitro* est comparable.

Si ces deux myotubularines sont tellement similaires, comment peut-on expliquer que des mutations dans leurs gènes respectifs soient à l'origine de deux pathologies humaines distinctes ? En effet, des mutations dans MTM1 sont responsables de la myopathie centronucléaire liée au chromosome X (XLCNM) affectant les muscles alors que des mutations dans MTMR2 sont à l'origine du syndrome de Charcot-Marie-Tooth type 4B, une neuropathie touchant le système nerveux périphérique.

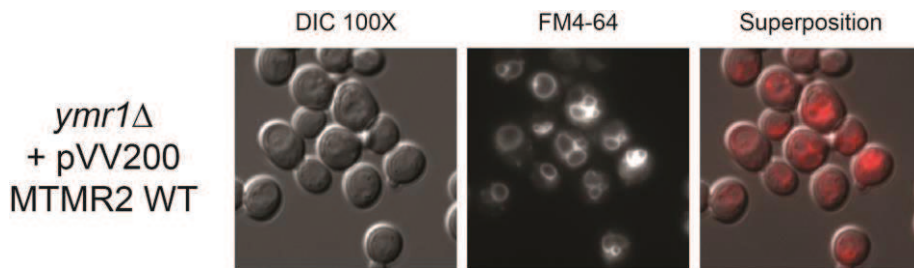
Je me suis proposé d'identifier des différences dans la fonction de ces deux myotubularines, très similaires en séquence et en structure, dans *S. cerevisiae* à la manière de ce que j'ai produit pour l'analyse de MTM1 et MTMR12. L'identification de particularités propres à l'une ou l'autre myotubularines dans le modèle levure pourrait potentiellement mener à des pistes pour expliquer leur spécificité de fonction dans les cellules humaines.

#### **A. La surexpression de MTMR2 dans *S. cerevisiae* n'altère pas la morphologie vacuolaire**

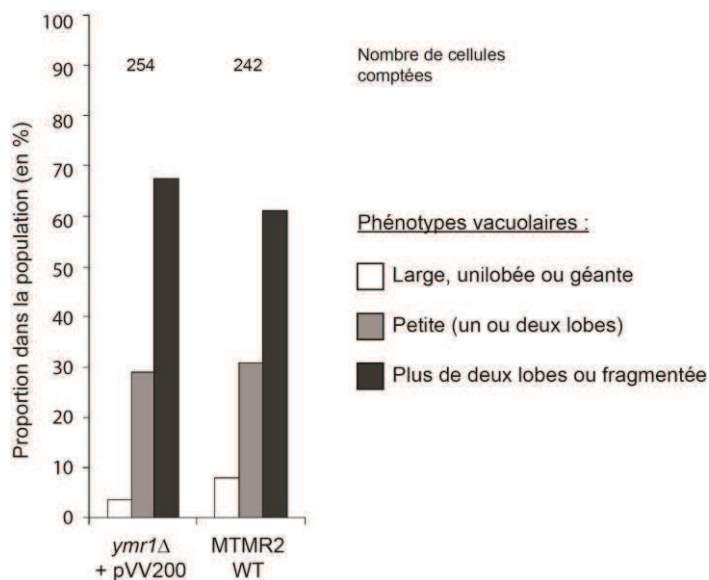
Tout d'abord, j'ai réalisé l'analyse des phénotypes vacuolaire en surexpression, à l'aide du même plasmide que celui utilisé pour l'analyse de MTM1, à savoir le plasmide pVV200 (épisomique, haut nombre de copie, promoteur fort *PGK*).

J'ai été surpris de constater que la surexpression de MTMR2 n'induit pas d'important élargissement vacuolaire dans les mêmes conditions que MTM1 dans *S. cerevisiae* (Figure 80). Cette observation est très étonnante dans la mesure où il a été montré que MTM1 et MTMR2 ont la même activité enzymatique *in vitro*. De ce fait, si MTMR2 était capable de déphosphoryler le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> intracellulaire dans *S. cerevisiae*, j'aurais dû observer des phénotypes « large vacuole ». En réalité, la surexpression de MTMR2 dans *S. cerevisiae* s'apparente à la surexpression d'un mutant catalytique inactif et les proportions des différents groupes de

morphologies vacuolaires sont comparables à celles des levures transformées avec le plasmide vide (Figure 81)



**Figure 80 : Observation microscopique de levures *ymr1Δ* transformées avec le plasmide pVV200\_MTMR2.** Les phénotypes vacuolaires, visibles ici par marquage de membrane de la vacuole au FM4-64, sont comparables à ceux de levures transformées avec le plasmide vide.



**Figure 81 : Quantification des morphologies vacuolaires des levures produisant MTMR2<sup>WT</sup>.** Les proportions de morphologies vacuolaires de chaque groupe sont comparables entre les cellules transformées avec le plasmide vide et celles produisant MTMR2.

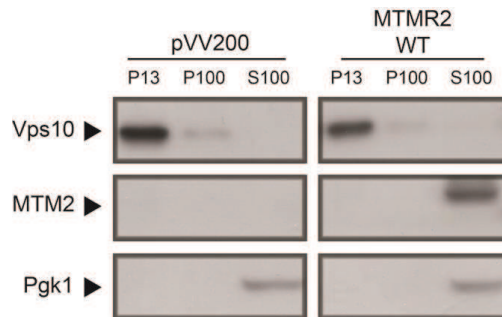
## DISCUSSION

De manière très surprenante, la surexpression de MTMR2 dans *S. cerevisiae* n'induit pas de phénotype « large vacuole » comme j'ai pu l'observer dans les levures surexprimant MTM1<sup>WT</sup>. Cette observation est d'autant plus étonnante qu'une étude a montré que la surexpression de MTMR2 dans la levure *Schizosaccharomyces pombe* induit un élargissement vacuolaire (Laporte et al., 2002). D'après les phénotypes vacuolaires, MTMR2 serait donc inactive *in vivo* dans *S. cerevisiae*.

## B. MTMR2 est cytosolique dans *S. cerevisiae*

Il a été montré que MTMR2 est une myotubularine enzymatiquement active et pourtant sa surproduction dans *S. cerevisiae* n'induit pas d'augmentation du volume vacuolaire. Si son activité enzymatique n'est pas en cause, MTMR2 pourrait ne pas déphosphoryler ses substrats pour d'autres raisons, comme une mauvaise localisation intracellulaire. Dans ce cas, MTMR2 ne serait simplement pas recrutée au niveau des endosomes pour hydrolyser le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>.

J'ai donc réalisé un fractionnement subcellulaire pour comparer sa distribution à celle de MTM1. Les résultats montrent que MTMR2 est exclusivement distribuée dans la fraction cytoplasmique S100 (Figure 82). Dans les mêmes conditions, MTM1 est distribuée dans les fractions P13 et P100 et est quasiment absente dans la fraction soluble S100 (Figure 53).



**Figure 82 : Fractionnement subcellulaire de levures surexprimant MTMR2.** MTMR2 est exclusivement détectée dans la fraction S100 correspondant aux protéines solubles. Cette distribution de MTMR2 est différente de celle de MTM1<sup>WT</sup>, laquelle est retrouvée dans les fractions associées aux membranes P13 et P100.

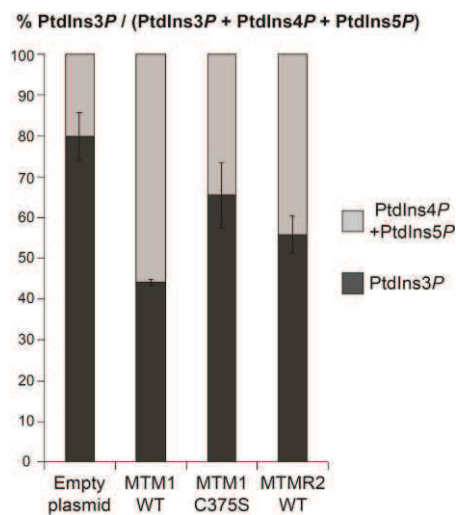
## DISCUSSION

MTMR2 est exclusivement détectée dans la fraction S100 contenant les protéines solubles. Ce résultat est particulièrement intéressant puisque dans les mêmes conditions, MTM1<sup>WT</sup> est distribuée de manière extrêmement reproductible et stable dans les fractions membranaires P13 et P100.

Cette différence de localisation entre les deux myotubularines suggère fortement que MTM1 et MTMR2 ont des fonctions intracellulaires différentes malgré leur remarquable similarité de séquence et de structure.

### C. MTMR2 est très peu active *in vivo* dans *S. cerevisiae*

De la même manière que celle présentée dans l'article, nous avons réalisé un dosage des PPIIn par marquage métabolique. Puis les différents PPIIn ont été extraits et préparés pour analyse par HPLC. Les résultats du dosage montrent que MTMR2 est peu active dans *S. cerevisiae* étant donné que la proportion de PtdIns3P détectée est plus proche des niveaux de PtdIns3P de levures surexprimant le mutant catalytique MTM1<sup>C375S</sup> que de ceux observés pour MTM1<sup>WT</sup> (Figure 83). Les niveaux de PtdIns3P des cellules produisant MTMR2 sont néanmoins plus faibles que ceux présents dans une souche transformée avec un plasmide vide, suggérant que MTMR2 conserve malgré tout une faible activité phosphatase à l'encontre de ce PPIIn.



**Figure 83 : Analyse des niveaux de PPIIn monophosphates de levures produisant différentes formes de MTMR2.** Quantification des niveaux de PtdIns3P dans des levures SEY6210 *ymr1Δ* transformées par des plasmides pVV204 codant pour la myotubularine MTM1<sup>WT</sup>, le mutant inactif MTM1<sup>C375S</sup> ou MTMR2<sup>WT</sup>. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de PtdIns3P radioactif par rapport aux PPIIn monophosphates marqués. Les résultats représentent la moyenne de deux expériences indépendantes.

## DISCUSSION

J'ai été surpris de constater que dans *S. cerevisiae*, MTMR2 n'est pas très active. En effet, des tests d'activité *in vitro* ont montré que MTMR2 a une activité phosphatase comparable à MTM1<sup>WT</sup> (Kim et al., 2002; Tronchere et al., 2004). Cette faible activité phosphatase *in vivo* (Figure 83) dans *S. cerevisiae* se reflète par l'absence de phénotypes « large vacuole » en microscopie (Figure 80 et Figure 81).

Néanmoins, dans *S. cerevisiae*, MTMR2<sup>WT</sup> est exclusivement cytoplasmique alors que MTM1<sup>WT</sup> est essentiellement associée aux membranes. Cette différence de localisation pourrait expliquer pourquoi MTMR2 n'est pas capable *in vivo*, dans la levure, de générer des phénotypes « large vacuole ». En effet, si MTMR2<sup>WT</sup> n'est pas recrutée aux niveaux des membranes décorées par ses substrats, le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, elle ne sera pas capable d'accomplir sa fonction phosphatase.

## **Partie II : Résultats et Discussion - Le domaine PH-GRAM de MTM1 et MTMR2 est parmi les domaines les moins conservés entre les deux myotubularines**

Les niveaux de PtdIns3P dans une levure produisant MTMR2<sup>WT</sup> sont toutefois plus faibles en comparaison à ceux observés dans la levure *ymr1Δ* transformées avec un plasmide vide, suggérant que MTMR2 est malgré tout responsable d'une légère diminution de PtdIns3P intracellulaire. Il est possible que cette faible hydrolyse du PtdIns3P soit aspécifique, dans la mesure où la localisation de MTMR2<sup>WT</sup> est probablement diffuse dans le cytoplasme. Ainsi, en condition de forte production de MTMR2<sup>WT</sup>, un certain nombre d'enzymes « flottant » librement dans le cytosol pourraient être capables d'hydrolyser les substrats rencontrés sur le chemin.

Pour le moment nous n'avons malheureusement pas réalisé de dosage en masse du PtdIns5P à partir de cellules produisant MTMR2, comme cela a été fait pour les mutants de MTM1 (Figure 4B de l'article). Je ne peux donc pas conclure quant à l'activité phosphatase *in vivo* de MTMR2<sup>WT</sup> à l'encontre du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>.

### **IV. Différences entre MTM1 et MTMR2**

#### **A. Le domaine PH-GRAM de MTM1 et MTMR2 est parmi les domaines les moins conservés entre les deux myotubularines**

Lorsque j'ai commencé l'analyse de MTMR2, j'ai rapidement pris connaissance de la grande similarité entre MTM1 et MTMR2, aussi bien en séquence peptidique ou en structure qu'en activité phosphatase *in vitro*. Mais sous cette apparente similarité se cachait le fait que des mutations dans ces deux myotubularines étaient responsables de deux pathologies humaines distinctes. De plus, *MTM1* et *MTMR2* sont exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules humaines (Bolino et al., 2002; Laporte et al., 1996) mais des mutations dans ces gènes conduisent à des défauts dans deux tissus différents : le muscle pour *MTM1*, les cellules de Schwann dans le cas de *MTMR2*. Cette spécificité tissulaire n'est à l'heure actuelle pas encore comprise.

Je m'attendais donc, dans un modèle de levure, un eucaryote simple, à observer une redondance dans la fonction de ces deux protéines, principalement liée à leur activité phosphatase. J'espérais alors trouver, ne serait-ce qu'une légère différence dans les phénotypes de levures, produisant d'un côté MTM1<sup>WT</sup> et de l'autre MTMR2<sup>WT</sup>, qui pourrait expliquer pourquoi deux protéines très similaires ont des fonctions biologiques distinctes chez l'Homme. Le fait est qu'aujourd'hui, ironiquement, j'espère identifier un point commun entre ces deux myotubularines, autre que leur activité phosphatase *in vitro*. En effet, les différentes expériences présentées dans le



## **Partie II : Résultats et Discussion - Le domaine PH-GRAM de MTM1 et MTMR2 est parmi les domaines les moins conservés entre les deux myotubularines**

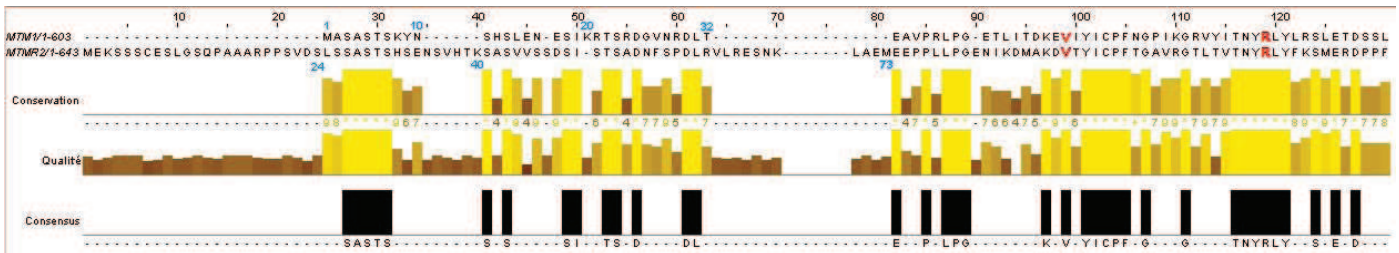
chapitre précédent montrent que MTMR2<sup>WT</sup> a une localisation intracellulaire différente de MTM1<sup>WT</sup> et une activité phosphatase *in vivo* différente de MTM1<sup>WT</sup> qui expliquent l'absence de phénotype vacuolaire, même en surproduction.

Je me suis alors demandé pour quelle(s) raison(s) MTMR2<sup>WT</sup> pourrait être localisée dans le cytoplasme. En observant mes comparaisons de séquences peptidiques entre MTM1 et MTMR2, je me suis aperçu que parmi les régions les moins conservées entre les deux myotubularines, on retrouvait les régions situées aux extrémités des protéines. En effet, la région C-terminale comprenant le motif coiled-coil et le site PDZ n'est identique entre les deux protéines qu'à hauteur de 38.5% alors que la moyenne sur l'ensemble des deux protéines est de 64.5%. Du côté amino-terminal, le pourcentage d'identité entre les domaines PH-GRAM de MTM1 et MTMR2 est également sous la moyenne d'identité entre les protéines complètes. Ainsi les deux domaines PH-GRAM sont identiques à hauteur de 55.6%, soit globalement un acide aminé sur deux (Figure 36).

Mon choix s'est porté sur l'analyse des différences entre les deux domaines PH-GRAM. Ce choix vient de l'observation qu'une myotubularine MTM1<sup>WT</sup> non-étiquetée est distribuée majoritairement dans les fractions membranaires en fractionnement subcellulaire, tandis qu'une protéine de fusion GFP-MTM1<sup>WT</sup> est présente à des niveaux comparables dans la fraction membranaire P13 et la fraction soluble S100.

Ainsi, le simple fait de juxtaposer la GFP à proximité du domaine PH-GRAM de MTM1<sup>WT</sup> a permis la relocalisation de la protéine GFP-MTM1 dans la fraction soluble S100 alors que mes traitements avec des agents chimiques et des solutions salines n'y ont rien fait. En réalité, si on laisse la frustration de côté, le point essentiel ici est que la protéine GFP-MTM1<sup>WT</sup> mime en partie la localisation de MTMR2<sup>WT</sup> dans le cytoplasme.

Un alignement de séquences des 100 premiers acides aminés des extrémités N-terminales de MTM1<sup>WT</sup> et MTMR2<sup>WT</sup> m'ont permis d'identifier des régions de MTMR2<sup>WT</sup> ne s'alignant avec aucune région de MTM1<sup>WT</sup>, et plus particulièrement 24 premiers acides aminés de MTMR2<sup>WT</sup>. Les autres régions, plus courtes se situent entre des régions conservées chez les deux protéines (Figure 84).



**Figure 84 : Alignement des séquences amino-terminales de MTM1 (en-haut) et MTMR2 (en-bas).** Les séquences peptidiques de MTM1 et de MTMR2 ont été alignées en utilisant le logiciel Jalview ([www.jalview.org/](http://www.jalview.org/)). Les numéros en bleu correspondent au numero de l'acide aminé dans la séquence de MTM1 (en-haut) ou de MTMR2 (en-bas). Les résidus V et R en rouge correspondent aux résidus V49 et R69 de MTM1.

## B. Génération des formes tronquées de MTMR2

L'alignement de séquence entre MTM1 et MTMR2 (Figure 84) révèle que les 24 premiers acides aminés de MTMR2 ne s'alignent avec aucune séquence de MTM1. Par ailleurs une séquence de six acides aminées situées en amont du résidu K40 de MTMR2 n'a pas d'identité avec MTM1<sup>WT</sup>. Enfin, une autre séquence de 13 acides aminés située juste avant le résidu M73 est également unique à MTMR2. Ces trois régions sont toutes situées en amont des résidus V49 et R69 de MTM1 (en rouge sur la Figure 84).

J'ai donc cloné trois formes de MTMR2 tronquées :

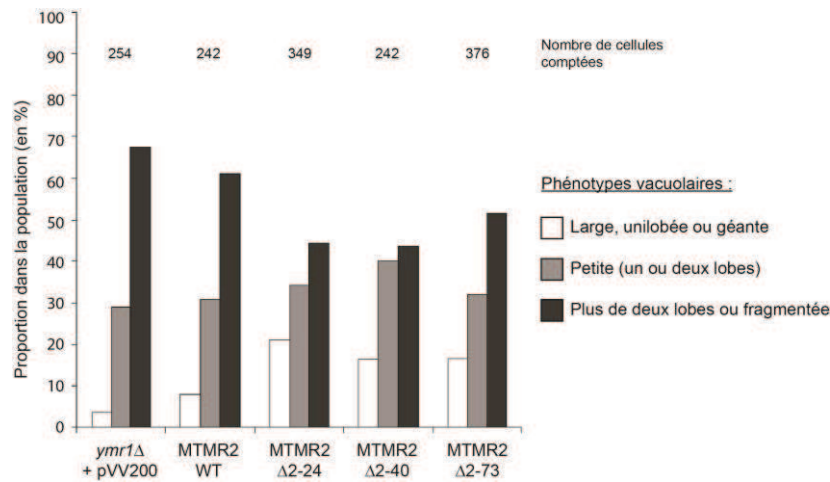
- MTMR2<sup>Δ2-24</sup> est déletée pour les 24 premiers acides aminés
- MTMR2<sup>Δ2-40</sup> est déletée pour les 40 premiers acides aminés
- MTMR2<sup>Δ2-73</sup> est déletée pour les 73 premiers acides aminés

Ces trois constructions ont été générées par PCR à partir du plasmide pVV200 codant pour MTMR2<sup>WT</sup> et clonées dans des plasmides pVV200 et pVV204 en utilisant le système de clonage par recombinaison Gateway<sup>®</sup>. J'ai par la suite transformé des souches de levures SEY6210 *ymr1Δ* avec les différentes constructions de MTMR2<sup>WT</sup> ou tronquées.

## C. Les formes tronquées de MTMR2 induisent un élargissement vacuolaire

L'analyse des phénotypes vacuolaires montrent que la production de MTMR2<sup>WT</sup> n'altère pas significativement la morphologie vacuolaire en comparaison aux cellules transformées avec le plasmide pVV200 vide. Cependant, la production de MTMR2<sup>Δ2-24</sup>, MTMR2<sup>Δ2-40</sup> et MTMR2<sup>Δ2-73</sup>

dans des levures *ymr1Δ* a révélé une augmentation de la proportion de cellules ayant des vacuoles élargies (Figure 85) démontrant que la délétion d'une région N-terminale de MTMR2 est responsable d'un phénotype « gain de fonction » dans *S. cerevisiae*.

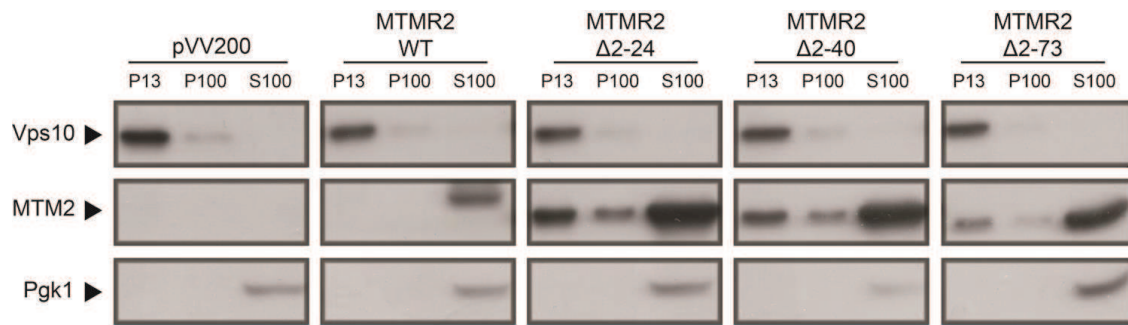


**Figure 85 : Morphologies vacuolaires de levures SEY6210 *ymr1Δ* produisant des formes tronquées de MTMR2.** Des levures SEY6210 *ymr1Δ* ont été transformées par un plasmide pVV200 vide, codant pour MTMR2<sup>WT</sup> ou différentes formes tronquées de MTMR2. Les barres de couleur représentent les différentes classes de morphologie vacuolaire.

#### D. Distribution subcellulaires des formes tronquées de MTMR2

La surexpression de formes tronquées de MTMR2, à savoir MTMR2<sup>Δ2-24</sup>, MTMR2<sup>Δ2-40</sup> et MTMR2<sup>Δ2-73</sup> dans *S. cerevisiae* est responsable d'un élargissement vacuolaire qui n'est pas visible lorsque la protéine MTMR2<sup>WT</sup> est surproduite dans *S. cerevisiae* (Figure 85). Ces observations suggèrent que les différentes formes tronquées sont capables de déphosphoryler les substrats PtdIns3P et PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> de manière plus efficace que la protéine sauvage.

J'ai par conséquent réalisé un fractionnement subcellulaire à partir d'extraits protéiques de levures produisant soit MTMR2<sup>WT</sup>, soit les différentes formes tronquées de MTMR2. Les résultats montrent que MTMR2<sup>WT</sup> est exclusivement localisée dans la fraction soluble. En revanche, les formes tronquées MTMR2<sup>Δ2-24</sup>, MTMR2<sup>Δ2-40</sup> et MTMR2<sup>Δ2-73</sup> présentent une distribution non négligeable dans les fractions membranaires P13 et P100. La forme MTMR2<sup>Δ2-24</sup>, correspondant à la forme de MTMR2 délétée uniquement pour pour les 24 premiers acides aminés affiche la distribution membranaire la plus significative parmi les formes tronquées (Figure 86).



**Figure 86 : Distribution subcellulaire des formes tronquées de MTMR2 dans *S. cerevisiae*.** Les extraits protéiques de levures SEY6210 transformées avec le plasmide pVV200 vide ou codant pour MTMR2<sup>WT</sup>, MTMR2<sup>Δ2-24</sup>, MTMR2<sup>Δ2-40</sup> ou MTMR2<sup>Δ2-73</sup> ont été soumis à un fractionnement subcellulaire. Alors que MTMR2<sup>WT</sup> est uniquement détectée dans la fraction S100, les formes tronquées de MTMR2 sont également présentes dans les fractions associées aux membranes P13 et P100.

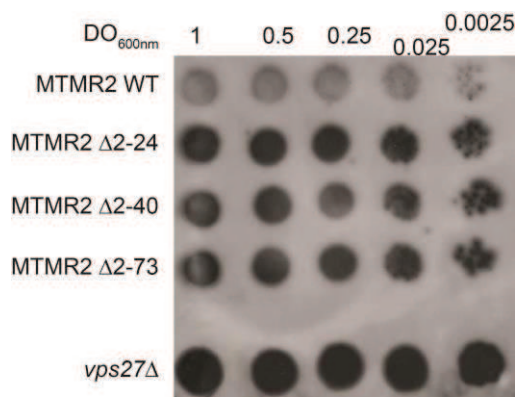
### E. Les formes tronquées de MTMR2 induisent une sécrétion de CPY

Mes précédentes observations montrent que les formes tronquées de MTMR2 sont susceptibles de déphosphoryler le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> de manière plus efficace que MTMR2<sup>WT</sup>. Leurs distributions en fractionnement subcellulaire montrent qu'elles sont présentes dans les fractions membranaires alors que MTMR2<sup>WT</sup> est exclusivement cytoplasmique.

Ainsi les myotubularines MTMR2<sup>Δ2-24</sup>, MTMR2<sup>Δ2-40</sup> et MTMR2<sup>Δ2-73</sup> pourraient être en partie localisées au niveau des endosomes où elles seraient susceptibles de déphosphoryler leurs substrats. Or mes précédents résultats montrent que la présence d'une myotubularine MTM1 active capable de déphosphoryler le PtdIns3P *in vivo* est responsable d'une perturbation du tri de la carboxypeptidase Y (CPY), laquelle est sécrétée dans le milieu extracellulaire.

J'ai donc analysé les effets de la surproduction des formes tronquées de MTMR2 sur la sécrétion de CPY. Les résultats montrent que les cellules produisant MTMR2<sup>WT</sup> sécrètent de faibles niveaux de CPY dans le milieu extracellulaire. La souche *vps27Δ*, un mutant du tri des protéines au niveau du MVB, sécrète la CPY en grande quantité et sert de contrôle (Figure 87).

De plus, la production des formes tronquées MTMR2<sup>Δ2-24</sup>, MTMR2<sup>Δ2-40</sup> et MTMR2<sup>Δ2-73</sup> induit significativement la sécrétion de CPY en comparaison à MTMR2<sup>WT</sup>. De manière intéressante, les levures produisant la forme MTMR2<sup>Δ2-24</sup> semblent sécréter des niveaux de CPY supérieurs à ceux observés pour les formes MTMR2<sup>Δ2-40</sup> et MTMR2<sup>Δ2-73</sup> (Figure 87). Les trois formes tronquées de MTMR2 induisent donc une perturbation du tri de protéines de la voie VPS responsable d'une sécrétion de CPY dans le milieu extracellulaire qui n'est pas visible dans le cas de cellules produisant la protéine sauvage MTMR2<sup>WT</sup>.



**Figure 87 : Analyse de la sécrétion de CPY dans des levures produisant les différentes formes tronquées de MTMR2.** Les levures SEY6210 *ymr1Δ* produisant la myotubularine MTMR2<sup>WT</sup> ou les différentes formes tronquées MTMR2<sup>Δ2-24</sup>, MTMR2<sup>Δ2-40</sup> et MTMR2<sup>Δ2-73</sup> ont été déposées en goutte en concentration décroissante, incubées 72h en contact avec une membrane de nitrocellulose. Puis la membrane est lavée pour éliminer les cellules attachées et la CPY est immunodétectée à la manière d'un Western Blot classique. Les levures produisant une forme enzymatiquement active de MTM1 présentent une importante sécrétion de CPY dans le milieu extracellulaire. En contrôle, la souche *vps27Δ*, rapportée comme présentant d'importants défauts de tri protéique et sécrétant la CPY a été utilisée.

### DISCUSSION GENERALE SUR L'ANALYSE DES FORMES TRONQUEES DE MTMR2

L'analyse de MTMR2 dans *S. cerevisiae* a révélé son lot de surprise. En effet, bien que la phosphatase MTMR2 soit en de nombreux points similaires à MTM1, leurs surexpressions dans la levure sont à l'origine de phénotypes distincts. Je ne suspectais pas que ces deux protéines puissent à être à l'origine de phénotypes à ce point différents dans *S. cerevisiae*. En effet, *in vitro* ces deux PPI 3-phosphatases ont la même spécificité de substrat et la même activité enzymatique. De plus elles partagent 64,5% d'identité et ont une organisation structurale remarquablement conservée.

Mes résultats mettent en évidence des localisations intracellulaires ainsi que des activités enzymatiques *in vivo* différentes pour MTM1 et MTMR2, ce qui corrèle avec le fait que des mutations dans les gènes *MTM1* et *MTMR2* sont responsables de deux pathologies différentes. Ainsi, les différences de fonctions cellulaires entre MTM1 et MTMR2 sont conservées dans un modèle « naïf » d'eucaryote unicellulaire, la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et permettent de mettre à jour des différences de fonctions cellulaires entre MTM1 et MTMR2.

Mes résultats montrent également que MTMR2<sup>WT</sup> possède 24 acides aminés N-terminaux (aa1-24) complètement absents chez MTM1<sup>WT</sup>. La délétion de cette courte séquence peptidique amino-terminale est suffisante pour relocaliser une partie de MTMR2 au niveau de structures membranaires dans la levure. J'ai pu montrer que la relocalisation de la forme tronquée de MTMR2 (MTMR2<sup>Δ2-24</sup>) est accompagnée d'un accroissement de la proportion de phénotypes « large vacuole » et d'une augmentation significative de la sécrétion de CPY.

Ceci suggère que les différentes formes de MTMR2, sauvage ou tronquées, conservent une activité phosphatase à l'encontre du PtdIns3P et du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> mais qu'en absence de recrutement de MTMR2<sup>WT</sup> en bonne place, elle est incapable d'hydrolyser ses substrats.

Mes résultats suggèrent également que la localisation de MTMR2<sup>WT</sup> dans le cytoplasme implique une courte séquence peptidique en amont du domaine PH-GRAM de MTMR2<sup>WT</sup> suffisante pour empêcher la localisation membranaire de la protéine. De manière très intéressante, une protéine MTM1, distribuée principalement dans les fractions membranaires lorsqu'elle n'est pas étiquetée, est relocalisée partiellement dans la fraction soluble lorsqu'elle est fusionnée à son extrémité N-terminale avec la GFP. Ceci suggère que l'addition d'une étiquette GFP à MTM1<sup>WT</sup>, mime la séquence de 24 acides aminés retrouvée chez MTMR2<sup>WT</sup> et que ceci est responsable de la localisation cytoplasmique des deux protéines.

Enfin, même si mes données suggèrent que les formes tronquées sont toujours enzymatiquement actives, il faudra de doser le PtdIns3P et le PtdIns5P intracellulaires pour déterminer leurs activités phosphatase *in vivo*.



## ❖ PARTIE III : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Lorsque j'ai débuté cette étude, mon objectif était que mes travaux puissent aider à l'élucidation des mécanismes responsables de deux pathologies humaines distinctes pour lesquelles de nombreuses questions restaient en suspens. Il avait notamment été montré que des mutations dans le gène *MTM1* sont responsables de la myopathie centronucléaire liée au chromosome X (XLCNM) tandis que des mutations dans le gène *MTMR2* sont à l'origine du syndrome de Charcot-Marie-Tooth type 4B1 (CMT4B1). Ces deux gènes sont exprimés de manière ubiquitaire chez les mammifères mais les symptômes chez l'Homme se manifestent dans un type bien précis de cellules, sans affecter de manière significative les autres tissus. En effet, la XLCNM se caractérise essentiellement par une hypotrophie musculaire résultant en une faiblesse musculaire généralisée et une détresse respiratoire souvent fatale dans les premières semaines suivant la naissance. La CMT4B1 se caractérise par une atteinte du système nerveux périphérique avec un repliement anormal de la gaine de myéline entourant les axones et occasionnant une faiblesse musculaire progressive, distale puis proximale, débutant dans les membres inférieurs.

En introduction, je vous ai présenté les deux grandes questions auxquelles je souhaitais apporter des réponses : « **Quels sont les dysfonctionnements responsables du développement de la XLCNM ?** » et « **Quelles sont les différences de fonction entre *MTM1* et *MTMR2* qui expliquent leurs implications dans deux pathologie distinctes ?** ». Dans cette partie, je vais tenter de synthétiser mes résultats en les confrontant à ces deux questions, chacune d'elles constituant un paragraphe critique de mes analyses.

### ***I. Quels sont les dysfonctionnements responsables du développement de la XLCNM ?***

Une des premières constatations que j'ai pu faire en débutant cette étude est qu'il apparaît que le nombre de paralogues augmente avec la complexification de l'organisme : une seule myotubularine chez *S. cerevisiae*, cinq myotubularines chez *C. elegans* et quinze paralogues de myotubularines chez les mammifères (Tableau 1). Le fait que ces différents paralogues aient été conservés au cours de l'évolution suggère qu'ils accomplissent tous une fonction importante pour l'intégrité de l'organisme. Ainsi, mes craintes, en étudiant une myotubularine humaine possédant



### Partie III : Conclusion Générale et Perspectives - Quels sont les dysfonctionnements responsables du développement de la XLCNM ?

14 paralogues humains dans un modèle unicellulaire de levure ne possédant qu'un seul homologue de myotubularine, était que l'analyse hétérologue de MTM1 dans un contexte « naïf » d'eucaryote (j'ai nommé *Saccharomyces cerevisiae*) pouvait ne pas être significative au regard de la fonction de MTM1 dans un contexte d'eucaryote multicellulaire complexe dans lequel MTM1 accomplit une fonction muscle-spécifique. Néanmoins, j'ai toujours plus considéré le modèle levure comme un outil que comme un modèle représentatif d'une cellule musculaire. En d'autre terme, j'estime avoir utilisé *S. cerevisiae* comme un « tube à essai high-tech » pour l'analyse de la myotubularine humaine MTM1.

Mes résultats, concernant l'expression de *MTM1* dans la levure *S. cerevisiae*, montrent que la production d'une myotubularine MTM1 enzymatiquement active est responsable d'un élargissement vacuolaire dans la levure. Les dosages du PtdIns3P et du PtdIns5P intracellulaires nous ont permis de confirmer cette tendance et d'identifier MTM1<sup>WT</sup>, MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup> et MTM1<sup>N180K</sup> comme étant enzymatiquement actives *in vivo* dans *S. cerevisiae* contrairement aux mutant MTM1<sup>C375S</sup> et MTM1<sup>R421Q</sup>.

Nous avons été surpris de constater que les mutations V49F, R69C et N180K, responsables de XLCNM, n'alteraient pas l'activité enzymatique de MTM1 aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. D'un côté ces observations ne sont pas surprenantes dans la mesure où ces mutations n'affectent pas le domaine catalytique, mais d'un autre côté ces mutants enzymatiquement actifs sont responsables de formes légères voire sévères de XLCNM alors qu'un mutant inactif MTM1<sup>R421Q</sup> est également responsable de forme sévère de XLCNM. Ces observations montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre l'activité enzymatique et la sévérité de la XLCNM, comme cela avait été suggéré précédemment.

De plus, dans *S. cerevisiae*, le détournement vers la voie de sécrétion de CPY, une protéase vacuolaire de levure normalement adressée dans le lumen de la vacuole, est étroitement lié à l'activité enzymatique des différentes formes de MTM1. Une nouvelle fois, ces résultats suggèrent que MTM1<sup>WT</sup>, MTM1<sup>V49F</sup>, MTM1<sup>R69C</sup> et MTM1<sup>N180K</sup> sont capables de déphosphoryler le PtdIns3P et/ou le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> endosomal résultant en une défaillance dans le tri des protéines au niveau des endosomes responsable du détournement de CPY vers le milieu extracellulaire. Cependant, la surproduction de MTM1<sup>WT</sup> n'affecte pas le processus d'endocytose en phase fluide, sous-entendant que les perturbations causées par la présence de myotubularines actives affectent principalement le tri des protéines membranaires mais pas l'acheminement de contenu soluble extracellulaire vers la vacuole.

Le point négatif de mes analyses est que je n'ai pas pu mettre en évidence de différence majeure entre les membres actifs et inactifs de myotubularines. Néanmoins mes résultats montrent que la surexpression des différentes formes de MTM1 dans *S. cerevisiae* permet un criblage rapide et efficace des myotubularines MTM1 enzymatiquement actives. Ainsi, grâce à la levure, nous montrons qu'il est possible de discriminer les myotubularines MTM1 enzymatiquement actives des myotubularines inactives lorsque celles-ci présentent des mutations faux-sens.

Mes analyses des différents mutants MTM1 atteignent, je pense, une limite au-delà de laquelle il serait présomptueux de tirer des conclusions quant à la fonction physiologique de MTM1 dans une cellule musculaire. Néanmoins, si le temps me le permettait, j'aurais encore quelques expériences à réaliser en surexprimant MTM1 dans *S. cerevisiae*.

Ainsi, j'aurais notamment à cœur d'identifier les pools de PtdIns3P et PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> déphosphorylés par les différentes formes de MTM1. En effet, il apparaît que la surproduction d'une myotubularine active dans une levure mutante SEY6210 *ymr1Δ* permet de retrouver des taux de PtdIns3P comparables à la levure SEY6210 sauvage. Ceci m'a surpris dans la mesure où je m'attendais à ce que la production massive d'une MTM1 active provoque une diminution drastique de PtdIns3P intracellulaire. Or nous retrouvons « au mieux » des taux similaires à la levure SEY6210 sauvage. Ceci suggère que MTM1 déphosphoryle un pool de PtdIns3P intracellulaire spécifique, probablement endosomal, sans hydrolyser le PtdIns3P ancré dans des membranes cellulaires distinctes, comme par exemple le PtdIns3P généré au niveau des vésicules autophagiques naissantes. En effet, la surproduction de MTM1 dans *S. cerevisiae* n'induit aucun défaut dans la voie d'autophagie/Cvt, suggérant que le PtdIns3P impliqué dans ce processus n'est pas affecté par la production massive d'une myotubularine active.

Je pourrais également profiter du fait qu'une étiquette GFP fusionnée à l'extrémité C-terminale de MTM1 semble ne pas affecter de manière sévère la localisation et l'activité de MTM1<sup>WT</sup>-GFP. Par conséquent, il serait intéressant de réaliser des analyses de co-localisation de MTM1-GFP avec des marqueurs de différents compartiments intracellulaires de levure afin de déterminer la préférence de MTM1 en terme de localisation intracellulaire.

Le fait que la protéine non-étiquetée soit essentiellement membranaires suggère que MTM1 est enrichi au niveau de structures membranaires suffisamment conséquentes pour permettre le recrutement de la quasi-totalité de MTM1 surproduite. Néanmoins, je ne peux pas exclure que la

### Partie III : Conclusion Générale et Perspectives - Quels sont les dysfonctionnements responsables du développement de la XLCNM ?

majorité de MTM1 soit accumulée sous la forme d'agrégats intracellulaires et que la proportion de MTM1 soluble soit suffisante pour induire les phénotypes « large vacuole ». Ainsi, la logique voudrait que des expériences complémentaires viennent confirmer ou infirmer l'hypothèse selon laquelle MTM1 pourrait former des agrégats dans *S. cerevisiae*. Cependant, j'ai malgré tout pu observer des différences d'activité enzymatique entre différents membres des myotubularines, notamment entre MTM1<sup>WT</sup> et MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> et MTM1<sup>V49F</sup> alors que leur distribution cellulaire est identique. Ces observations n'appuient pas l'hypothèse des agrégats.

Concernant l'interaction de MTM1 avec MTMR12, j'ai pu montrer que ces deux myotubularines interagissent dans *S. cerevisiae*, à l'instar de ce qui avait été montré dans des cellules humaines. Néanmoins, dans les cellules humaines, l'association de MTM1 avec MTMR12 induit une relocalisation des myotubularines MTM1 de la membrane plasmique vers le cytoplasme. L'interaction MTM1<sup>WT</sup>/MTMR12 dans la levure ne m'a pas permis d'identifier une fonction spécifique du complexe par rapport à MTM1<sup>WT</sup> produite seule. En effet, seules ou en complexe, dans *S. cerevisiae*, les protéines sont essentiellement associées aux membranes et n'ont jamais présenté de distribution cytoplasmique.

Néanmoins, la surproduction d'une protéine GFP-MTM1 (fusionnée à la GFP à son extrémité N-terminale) induit une relocalisation partielle de la protéine dans le cytoplasme des levures. Par conséquent, un éventuel masquage du domaine PH-GRAM par la GFP par le biais d'un encombrement stérique pourrait être à l'origine de cette relocalisation. Ainsi dans les cellules humaines, il est possible que l'association MTM1/MTMR12 soit impliquée dans un « masquage » similaire du domaine PH-GRAM de MTM1<sup>WT</sup> induisant une relocalisation du complexe dans le cytoplasme. Mes résultats montrent que tel n'est pas le cas dans *S. cerevisiae* puisque l'interaction de MTM1 avec MTMR12 n'induit aucune relocalisation du complexe dans le cytoplasme.

Ainsi, l'analyse de l'interaction entre une protéine GFP-MTM1 et une protéine MTMR12 non étiquetée pourrait donner des indices quant à la fonction du domaine PH-GRAM dans la localisation de MTM1<sup>WT</sup> dans la levure et dans les cellules humaines dépendante de MTMR12. D'autre part, le dosage du PtdIns3P et du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> intracellulaire de cellules produisant le complexe MTM1/MTMR12 pourrait permettre de mettre en évidence une éventuelle différence de spécificité de substrat du complexe par rapport à la protéine seule.

Mes résultats montrent aussi qu'il est dangereux de tirer des conclusions sur la localisation intracellulaire d'une protéine hétérologue sur l'unique base d'observations microscopiques de protéines de fusion, car l'étiquette pourrait masquer un site fonctionnel important, comme c'est le cas pour GFP-MTM1 dans la levure.

### **Partie III : Conclusion Générale et Perspectives - Quelles sont les différences de fonctions entre MTM1 et MTMR2 qui expliquent leurs implications dans deux pathologies distinctes ?**

**« Quels sont les dysfonctionnements responsables du développement de la XLCNM ? ».**

Mon avis personnel est qu'il serait audacieux de tirer des conclusions quant aux défauts causés par les mutations V49F, R69C et N180K en utilisant comme modèle la levure *S. cerevisiae*. En effet, si MTM1 a acquis une fonction muscle-spécifique chez les mammifères au cours de l'évolution, comment être sûr que l'analyse de MTM1 dans la levure *S. cerevisiae*, ne possédant pas de muscle, permettra de discriminer la fonction cellulaire basale (activité phosphatase) de la fonction muscle-spécifique de MTM1 dans les cellules musculaires de mammifères (recrutement par des effecteurs muscle-spécifiques) ? L'analyse des mutants de MTM1 de cette étude a permis d'identifier des similarités entre les différents mutants actifs mais pas de différences objectives. Je n'ai donc malheureusement à ce jour pas pu démontrer pour quelle raison les mutants V49F, R69C et N180K sont responsables de XLCNM alors que leur activité phosphatase n'est pas significativement affectée. Néanmoins l'activité phosphatase des myotubularines n'explique pas, à elle seule, les symptômes de XLCNM.

En effet, nos résultats en collaboration avec le laboratoire de Jocelyn Laporte, présentés en tout début de la partie « résultats » de ce manuscrit, montrent que des myotubularines inactives sont capables de compenser partiellement l'absence d'une myotubularine sauvage chez la souris. Ces résultats montrent également que la myotubularine MTM1, au-delà de son activité phosphatase, possède une fonction cellulaire indépendante impliquant probablement des interactions protéine-protéine. Parmi ces interactions, nous proposons que l'interaction de MTM1 avec la desmine, de manière indépendante de son activité phosphatase, joue un rôle essentiel dans la maintenance des fibres musculaires.

#### **II. Quelles sont les différences de fonctions entre MTM1 et MTMR2 qui expliquent leurs implications dans deux pathologies distinctes ?**

Comme mentionné précédemment, je ne pensais pas pouvoir identifier de différences majeures entre MTM1 et MTMR2 dans *S. cerevisiae* au vu de leur grande similarité. Je suspectais pour ces deux protéines une fonction globale identique mais pouvant être modulée dans un contexte tissu-spécifique. Ainsi, dans un eucaryote unicellulaire, je pensais ne pas pouvoir être en mesure d'identifier de différence majeure dans la fonction cellulaire de ces deux protéines. Leurs séquences peptidiques sont d'ailleurs tellement similaires que la structure de MTM1 a été prédite sur la base de la structure de MTMR2, la seule myotubularine dont la structure tridimensionnelle a été résolue à ce jour.

### **Partie III : Conclusion Générale et Perspectives - Quelles sont les différences de fonctions entre MTM1 et MTMR2 qui expliquent leurs implications dans deux pathologies distinctes ?**

J'ai été surpris de constater que la surexpression de *MTMR2* n'induit pas d'élargissement vacuolaire dans *S. cerevisiae* contrairement à la surexpression de *MTM1*. Ces résultats suggèrent que bien qu'elles aient la même activité phosphatase *in vitro*, *MTMR2* est très peu active *in vivo* dans *S. cerevisiae*. Ceci a été confirmé par un dosage du PtdIns3P intracellulaire de cellules surproduisant *MTMR2* dans lesquels les niveaux de PtdIns3P sont significativement plus élevés que dans le cas de levures surproduisant *MTM1*.

Au vu de ces différences, j'ai entrepris de modifier *MTMR2* pour rapprocher la séquence de son domaine PH-GRAM de celle du domaine PH-GRAM de *MTM1*. En effet, une différence évidente résidait dans une séquence de 24 acides aminés amino-terminaux du domaine PH-GRAM de *MTMR2*. Ces résidus ne présentaient aucune identité avec des résidus de *MTM1* lors d'alignements de séquence. De plus, GFP-*MTM1* présentait une localisation cytosolique absente pour la protéine non-étiquetée, suggérant que la présence de la GFP à l'extrémité N-terminale pouvait jouer un rôle similaire aux 24 premiers acides aminés présent chez *MTMR2*.

De manière extrêmement intéressante, la délétion des 24 premiers acides aminés de *MTMR2* induit une relocalisation partielle de *MTMR2*<sup>Δ2-24</sup> dans les fractions membranaires, une distribution qui n'a jamais été observée pour *MTMR2*<sup>WT</sup>. Cette relocalisation membranaire est accompagnée d'une augmentation des phénotypes « large vacuole » et d'une augmentation de la sécrétion de CPY pour les souches surproduisant la forme tronquée *MTMR2*<sup>Δ2-24</sup>.

Par conséquent, mes résultats montrent que je suis parvenu à augmenter l'activité de *MTMR2* *in vivo* en éliminant les 24 acides aminés N-terminaux, rendant *MTMR2*<sup>Δ2-24</sup> encore plus proche en séquence de *MTM1*.

Ces résultats suggèrent que l'une des différences pouvant expliquer les différentes fonctions intracellulaire de *MTM1* et *MTMR2* réside dans la séquence de leurs domaines PH-GRAM et plus particulièrement les 24 premiers acides aminés de *MTMR2*.

Je serais également particulièrement curieux d'analyser les phénotypes vacuolaires de levures co-exprimant *MTMR2*/*MTMR13* ou *MTMR2*/*MTMR5* ainsi que les phénotypes en co-expression avec la forme tronquée *MTMR2*<sup>Δ2-24</sup> avec *MTMR13* ou *MTMR5*. Il est également envisageable de réaliser des dosages à partir des souches produisant ces différents complexes de myotubularines afin de déterminer si l'interaction de *MTMR2* (ou *MTMR2*<sup>Δ2-24</sup>) avec *MTMR13* ou *MTMR5* modifie sa localisation ou son activité *in vivo* dans la levure.

### III. Nouvelles questions ?

Je pense que mes travaux de thèses ont répondu en partie aux questions que je m'étais posé en commençant ce projet de thèse. Mais comme souvent en biologie, lorsqu'on répond à une question, deux nouvelles questions font surface.

Mes principales interrogations pour la suite de ce projet concernent la localisation membranaire des différentes formes de MTM1. En effet, les différentes mutations analysées dans cette étude ne modifient pas la distribution de MTM1 dans les fractions membranaires lors de fractionnement subcellulaires. Néanmoins la fusion de MTM1 avec la GFP en position N-terminale, à proximité du domaine PH-GRAM, induit la relocalisation d'une partie de GFP-MTM1 dans la fraction cytoplasmique. A l'inverse MTMR2 est exclusivement cytoplasmique mais la délétion des 24 premiers acides aminés relocalise partiellement MTMR2 dans les fractions membranaires. Ces résultats montrent que le domaine PH-GRAM de MTM1 et le domaine PH-GRAM de MTMR2 ont des rôles opposés dans l'adressage de ces deux myotubularines.

L'une des suites logiques de ce projet serait donc de déterminer les résidus de la région N-terminale des domaines PH-GRAM importants pour la localisation de MTM1 et MTMR2 dans *S. cerevisiae*. Je serais également curieux de savoir si cette localisation est dépendante d'une interaction entre le domaine PH-GRAM et une protéine effectrice de levure. Néanmoins, si tel est le cas, cette protéine effectrice devrait être impliquée dans un mécanisme conservé entre les cellules de levures et les cellules humaines. Bien que cela soit peu probable, il n'en reste pas moins que le métabolisme des PPI<sub>n</sub> est très conservé entre la levure et l'Homme, et par conséquent si les localisations de MTM1 et MTMR2 sont dépendantes de l'une de ces protéines, la levure pourrait apporter de précieuses indications quant à la régulation de ces deux myotubularines.

Au vu de leurs distributions intracellulaires opposées dans *S. cerevisiae*, le clonage d'une protéine chimère constituée du domaine PH-GRAM de MTM1 fusionnée à la protéine MTMR2 délétée pour son domaine PH-GRAM pourrait permettre de déterminer si le domaine PH-GRAM de MTM1 est suffisant pour induire une localisation membranaire. L'expérience inverse est aussi envisageable : le domaine PH-GRAM de MTMR2 en fusion avec MTM1<sup>ΔPH-GRAM</sup>. L'analyse de la localisation de ces protéines chimères, de leur capacité à déphosphoryler leurs substrats ainsi qu'à interagir avec leurs partenaires inactifs pourrait permettre de déterminer l'importance du domaine PH-GRAM dans la localisation des deux myotubularines.

J'ai également montré que MTM1<sup>WT</sup> interagit avec MTMR12 dans *S. cerevisiae*. En revanche je n'ai pas testé l'interaction des différents mutants de MTM1 avec MTMR12, faute de temps. Il sera d'un intérêt particulier d'analyser ces interactions. En effet, si le domaine PH-GRAM est impliqué dans l'hétérodimérisation, les mutations V49F et R69C pourraient influencer la capacité de ces deux myotubularines à s'associer. Un défaut dans leur interaction *in vivo* dans *S. cerevisiae*, serait une piste supplémentaire pouvant expliquer pourquoi les mutants MTM1<sup>V49F</sup> et MTM1<sup>R69C</sup> sont impliqués dans la XLCNM alors que leurs activités phosphatases ne sont pas affectées.

Une question que je me suis posé dernièrement et que j'aurais aimé creuser est la suivante : « Est-ce que la formation de dimères de myotubularines augmente l'affinité du complexe pour ses substrats ou est-ce que la liaison d'une myotubularine avec ses substrats augmente la capacité d'hétérodimérisation ? ». Il serait en effet intéressant d'envisager la possibilité que l'interaction entre deux myotubularines soit favorisée par la liaison de l'un des partenaires avec son substrat. Je proposerais, pour répondre à cette question, d'analyser la capacité de dimérisation de deux myotubularines partenaires, purifiées séparément, dans un contexte *in vitro* en présence ou en absence de leurs substrats.

**En résumé, mes résultats mettent en avant la nécessité d'interpréter avec prudence les observations faites dans le cas de pathologies affectant des phosphatases. En effet, les manifestations de la maladie pourraient être causées par des mécanismes n'étant pas liés uniquement à l'activité enzymatique de ces protéines.**

Ainsi si l'activité catalytique phosphatase n'est pas le facteur clef de la maladie, ceci explique mieux comment des myotubularines phosphatases-inactives, telles que MTMR13, sont aussi responsables de maladies, ceci implique également de rechercher les causes de la maladie en partant sur d'autres pistes, telles que les interactions protéine-protéine par exemple. En conclusion, l'étude de ces différentes phosphatases dans *S. cerevisiae* devrait permettre de mieux caractériser chez l'Homme les mécanismes cellulaires responsables du développement de maladies neuromusculaires comme la myopathie centronucléaire liée au chromosome X ou le syndrome de Charcot-Marie-Tooth de type 4 avec toutes les réserves émises au cours de mon manuscrit sur les limites du modèle levure.







## ❖ PARTIE IV : REFLEXION PERSONNELLE

Dans cet ultime chapitre de ma thèse, je souhaiterais livrer une analyse plus personnelle de ce qu'ont été pour moi ces quatre années de ma vie. En effet, on m'a toujours soutenu que la rédaction d'un manuscrit de thèse était un moyen d'exposer de manière critique et personnelle les résultats obtenus au cours de ses années de thèse et que ce manuscrit devait également refléter le caractère de celui qui la rédige. C'est pourquoi je voudrais, par l'intermédiaire de cet épilogue, signer d'une manière singulière les dernières lignes de mon manuscrit. Conclure par une partie sans aucune notion scientifique poussée plaira à coup sûr aux courageux « non-scientifiques » qui auront eu le cran de lire mon manuscrit jusqu'à ce stade (ou les tricheurs qui auront été intrigués par cette partie à la lecture du sommaire).

Après mes insouciantes années sur les bancs de l'université de Strasbourg, j'ai eu l'ambition folle de m'engager dans une thèse en biologie. Après quelques entretiens, j'ai décidé de rejoindre le laboratoire de Sylvie FRIANT pour plusieurs raisons. La première, sans doute la plus importante pour moi à l'époque, était que je n'avais à sacrifier aucune souris, aucun rat ou aucun lapin. L'idée d'avoir à abattre un animal pour les besoins de mes expériences m'était insupportable, surtout si les résultats s'avéraient négatifs. C'est pourquoi, plutôt que d'abattre quelques dizaines de souris au cours de ma thèse, j'ai opté pour le massacre de (probablement plusieurs) milliards de levures. Si toute vie est précieuse à **Ses** yeux, je crains que le chemin ma rédemption soit long.

La seconde raison pour laquelle Sylvie m'a convaincu de rejoindre son équipe, c'est que j'aurais été amené à étudier une protéine humaine impliquée dans une pathologie musculaire : une myopathie. Etant donné que j'avais déjà regardé un jour le Téléthon à la télévision, j'ai compris un minimum de quoi il retournait. Mais l'aspect concret de cette étude m'a beaucoup plu, plus précisément le fait d'aider à la compréhension d'une maladie humaine ... le tout sans avoir à tuer d'innocents rongeurs.

La dernière raison pour laquelle j'ai rejoint l'équipe de Sylvie, sans aucun doute celle qui a tout fait basculer, c'est l'enthousiasme de Sylvie quant elle parle de Sciences. Après quelques temps, on se rend compte que Sylvie parle avec le même enthousiasme de l'ubiquitination de cargos au niveau du MVB que de paniers de légumes BIO. Sylvie est parfois désespérante d'enthousiasme, transpirante d'optimisme mais le fait est que Sylvie donne la pêche. Pendant ces quatre années de thèse, j'ai traversé des moments difficiles, de

doutes, de frustrations, de stress intense ou de déboires sentimentaux mais ma directrice de thèse a toujours encadré mon travail avec la même fougue, m'autorisant à suivre des formations, à assister aux soutenances de thèse d'amis et à faire du monitorat.

Le monitorat auquel j'ai eu la chance de participer, n'était pas un monitorat classique. En effet, je n'ai ni enseigné en Travaux Dirigés, ni encadré de jeunes universitaires lors de Travaux Pratiques et encore moins surveillé les étudiants en examen. Ce monitorat-là était sans aucun doute bien plus amusant : l'opération « OpenLAB », créée par l'école doctorale « Vie et Santé » de Strasbourg et gérée par les Dr. Laurence MARECHAL-DROUARD et Michel LABOUESSE.

L'originalité d'OpenLAB réside dans le concept d'un laboratoire ambulante. En effet, les élèves visés par cette opération sont des lycéens de Terminale S, spécialité SVT. Sur fond d'énigme criminelle, les lycéens sont amenés à réaliser eux-mêmes une réaction de PCR afin d'amplifier des fragments d'ADN « supposés » humains et de confondre le coupable parmi deux suspects. Les informations concernant cette opération sont disponibles sur le site <http://www-ed-svds.u-strasbg.fr/openlab/intro/intro.php>. Globalement, les objectifs de cette opération sont d'une part de familiariser les lycéens avec les conditions de travail dans un laboratoire de recherche en biologie, de démystifier les aprioris que les lycéens ont sur les chercheurs en biologie (des gens en blouses blanches, pas drôles, n'ayant aucune vie sociale et ne prenant pas soin d'eux), d'éveiller éventuellement des vocations mais surtout de les faire manipuler du matériel de laboratoire en réalisant le mélange réactionnel pour l'amplification par PCR puisque nous n'intervenons presque pas dans les manipulations.

OpenLAB a été une soupape de décompression phénoménale. Partir à l'aventure, en voiture, le coffre chargé de matériel de laboratoire (micropipettes, gants, thermocycleur, centrifugeuse, cuve d'électrophorèse, tampons, etc ...), à parfois plus de 150 km de Strasbourg, m'a souvent permis de déconnecter le temps d'une journée et de prendre un peu de recul sur mes résultats. OpenLAB a été une excellente expérience qui n'a malheureusement duré qu'un an. Je suis extrêmement reconnaissant envers Sylvie de m'avoir permis de vivre cette expérience, sachant que j'étais par conséquent moins présent à la paillasse.

J'ai également rencontré des gens formidables au cours de ma thèse, des doctorants comme moi pour la plupart, avec qui partager mes problèmes autour d'une bonne bière

alsacienne, autour de la table d'un pub un soir de quizz, ou autour d'une table de snooker un soir de détente.

Rétrospectivement, si je pouvais revenir 4 ans en arrière, je pense que je ne changerais pas grand chose. Ces quatre années m'ont grandi, scientifiquement et humainement. Ca n'a évidemment pas toujours été très comique mais je pense que je resterai toujours un petit peu nostalgique de cette période pendant laquelle j'étais à la fois salarié et étudiant (ou « saladiant »).

Pour moi une page se tourne ... celle-ci est la dernière de mon manuscrit.



# ❖ MATERIEL ET METHODES

## I. Souches de levures

Souche	Signe	Génotype	Source
SEY6210	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	<i>leu2-3,112; ura3-52; his3<math>\Delta</math>200; trp1<math>\Delta</math>901; lys2-801; suc2<math>\Delta</math>9</i>	<i>S. Emr</i>
SEY6210 <i>ymr1<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	SEY6210 ; <i>YMR1::HIS3</i>	<i>S. Emr</i>
SEY6210.1 <i>ymr1<math>\Delta</math> sjl3<math>\Delta</math></i>	<i>MAT A</i>	SEY6210 ; <i>YMR1::HIS3 ; SJL3::TRP1</i>	<i>S. Emr</i>
SEY6210 <i>fab1<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	SEY6210 ; <i>FAB1::HIS3</i>	<i>S. Emr</i>
SEY6210 <i>vps34<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	SEY6210 ; <i>VPS34::TRP1</i>	<i>S. Emr</i>
BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	<i>his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0</i>	<i>Saccharomyces Genome Deletion Project</i>
BY4742 <i>vps34<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	BY4742 ; <i>VPS34::kanMX</i>	<i>Saccharomyces Genome Deletion Project</i>
BY4742 <i>fab1<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	BY4742 ; <i>FAB1::kanMX</i>	<i>Saccharomyces Genome Deletion Project</i>
BY4742 <i>vac14<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	BY4742 ; <i>VAC14::kanMX</i>	<i>Saccharomyces Genome Deletion Project</i>
BY4742 <i>fig4<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	BY4742 ; <i>FIG4::kanMX</i>	<i>Saccharomyces Genome Deletion Project</i>
BY4742 <i>ypt6<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	BY4742 ; <i>YPT6::kanMX</i>	<i>Saccharomyces Genome Deletion Project</i>
ABYS-1	?	SEY6210 ; <i>pep4<math>\Delta</math>prb1<math>\Delta</math>prc1<math>\Delta</math>cps1<math>\Delta</math></i>	
WCG4	<i>MAT a</i>	SEY6210	Dieter Wolf
WCG4 4-11/22	<i>MAT a</i>	SEY6210 ; <i>pre1-1pre2-2</i>	Dieter Wolf

## II. Souches bactériennes

- **XL1-Blue** pour l'amplification de plasmide ; génotype : *recA1 ; endA1 ; gyrA96 ; thi-1 ; hsdR17 (rk-,mk+) ; supE44 ; relA1 ; lac [F' proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*.

- **Rosetta™ (pLysS)** pour la production de protéines ; génotype : *F<sup>-</sup> ; ompT ; lon ; hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) ; gal ; dcm (DE3) ; pLysSRARE (Cam<sup>r</sup>)*. Sa particularité d'être mutée dans les protéases *ompT* et *lon* réduit la protéolyse. Le plasmide *pLysSRARE* porte sept gènes codant pour des ARNt et décodant des codons rarement utilisés par *E. coli* mais plus communs chez les eucaryotes.

- **XL10-Gold® Ultracompetent Cells (STRATAGENE)** pour l'amplification de plasmide après mutagenèse dirigée ; génotype : *Tet<sup>r</sup>  $\Delta$ (mcrA)183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]*

### III. Plasmides

#### A. Plasmides de levures

Une grande partie des constructions de plasmides utilisées dans cette étude ont été réalisées à l'aide de la technologie « Gateway™ Recombinational Cloning » permettant des clonages et sous-clonages rapides et aisés par système de recombinaison (Gari *et al.*, 1996). Les plasmides de clonage Gateway™ de levure ont été obtenus du consortium européen EUROSCARF (Van Mullem *et al.*, 2003). Ce sont tous des vecteurs navettes *E. coli* / *S. cerevisiae*. Pour leur répllication et leur sélection dans *E. coli*, ils contiennent une origine de répllication *E. coli* (origine *ColE1*) et le gène de résistance à l'ampicilline (*bla*). Pour leur répllication et leur sélection dans la levure *S. cerevisiae* ils possèdent en plus une origine de répllication de levure de type centromérique CEN (faible nombre de copies) ou épisomique 2μ (haut nombre de copies) et un gène conférant une prototrophie au tryptophane (gène *TRP1*) ou à l'uracile (gène *URA3*) à la levure transformée.

Le gène *ccdB*, flanqué des sites de recombinaison dans les vecteurs « sans insert », code pour une toxine qui agit sur une gyrase bactérienne essentielle. Sa production est donc létale dans la majorité des bactéries. Néanmoins, il est possible d'amplifier ces plasmides grâce à des bactéries résistantes à la toxine *ccdB*, telles que les bactéries DB3.1 (Invitrogen). Ces bactéries possèdent l'allèle *gyrA462*, insensible aux effets de la toxine. A la suite du clonage par recombinaison, ce gène permet une sélection positive des bactéries transformées par les vecteurs recombinés. En effet, les bactéries transformées par des vecteurs non recombinés (possédant toujours le gène *ccdB*) seront tuées par la toxine.

Plasmide / Construction	Insert	Marqueur de sélection en bactéries	Marqueur de sélection en levures	Origine de répllication en levures	Promoteur	Source
pVV200	<i>ccdB</i>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	Euroscarf
pVV204	<i>ccdB</i>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	Euroscarf
pVV208	<i>ccdB</i>	Amp ( <i>bla</i> )	URA3	CEN	<i>TetO</i>	Euroscarf
pVV214	<i>ccdB</i>	Amp ( <i>bla</i> )	URA3	2μ	<i>PGK1</i>	Euroscarf
pVV200	HsMTM1	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	G. Kaneva
pVV200	HsMTM1 <sup>C375S</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	G. Kaneva
pVV200	HsMTM1 <sup>S376N</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	<b>Cette étude</b>
pVV200	HsMTM1 <sup>V49F</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	G. Kaneva

Plasmide / Construction	Insert	Marqueur de sélection en bactéries	Marqueur de sélection en levures	Origine de réplication en levures	Promoteur	Source
pVV200	HsMTM1 <sup>R69C</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	G. Kaneva
pVV200	HsMTM1 <sup>N180K</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	G. Kaneva
pVV200	HsMTM1 <sup>R421Q</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	G. Kaneva
pVV200	HsMTMR2	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	G. Kaneva
pVV200	HsMTMR2 Δ2-24	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	<b>Cette étude</b>
pVV200	HsMTMR2 Δ2-40	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	<b>Cette étude</b>
pVV200	HsMTMR2 Δ2-73	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	<b>Cette étude</b>
pVV200	HsMTM1 ΔPH-GRAM	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	<b>Cette étude</b>
pVV200	PH- GRAM <sup>MTM1 WT</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>PGK1</i>	<b>Cette étude</b>
pVV204	HsMTM1 <sup>WT</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	G. Kaneva
pVV204	HsMTM1 <sup>C375S</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	G. Kaneva
pVV204	HsMTM1 <sup>S376N</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	<b>Cette étude</b>
pVV204	HsMTM1 <sup>V49F</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	G. Kaneva
pVV204	HsMTM1 <sup>R69C</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	G. Kaneva
pVV204	HsMTM1 <sup>N180K</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	G. Kaneva
pVV204	HsMTM1 <sup>R421Q</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	G. Kaneva
pVV204	HsMTMR12 / 3-PAP	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	G. Kaneva
pVV204	HsMTMR2 Δ2-24	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	<b>Cette étude</b>
pVV204	HsMTMR2 Δ2-40	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	<b>Cette étude</b>
pVV204	HsMTMR2 Δ2-73	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	<b>Cette étude</b>
pVV204	HsMTM1 ΔPH-GRAM	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	<b>Cette étude</b>
pVV204	PH- GRAM <sup>MTM1 WT</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	CEN	<i>TetO</i>	<b>Cette étude</b>
pVV208	HsMTM1 <sup>WT</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	URA3	CEN	<i>TetO</i>	G. Kaneva



Plasmide / Construction	Insert	Marqueur de sélection en bactéries	Marqueur de sélection en levures	Origine de réplication en levures	Promoteur	Source
pVV208	HsMTM1 <sup>C375S</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	URA3	CEN	<i>TetO</i>	G. Kaneva
pVV208	HsMTM1 <sup>WT</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	URA3	CEN	<i>TetO</i>	G. Kaneva
pAG424GPD_ EGFP-ccdB (pRS424 backbone)	ccdB	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	S. Lindquist
pAG424GPD_ ccdB-EGFP (pRS424 backbone)	ccdB	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	S. Lindquist
pAG424GPD_ EGFP-ccdB	HsMTM1	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	<b>Cette étude</b>
pAG424GPD_ EGFP-ccdB	HsMTM1 ΔPH-GRAM	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	<b>Cette étude</b>
pAG424GPD_ EGFP-ccdB	PH- GRAM <sup>MTM1 WT</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	<b>Cette étude</b>
pAG424GPD_ EGFP-ccdB	HsMTMR2 Δ2-24	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	<b>Cette étude</b>
pAG424GPD_ EGFP-ccdB	HsMTMR2 Δ2-40	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	<b>Cette étude</b>
pAG424GPD_ EGFP-ccdB	HsMTMR2 Δ2-73	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	<b>Cette étude</b>
pAG424GPD_ ccdB-EGFP	HsMTM1	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	<b>Cette étude</b>
pAG424GPD_ ccdB-EGFP	HsMTM1 ΔPH-GRAM	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	<b>Cette étude</b>
pAG424GPD_ ccdB-EGFP	PH- GRAM <sup>MTM1 WT</sup>	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	<b>Cette étude</b>
pAG424GPD_ ccdB-EGFP	HsMTMR2 Δ2-24	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	<b>Cette étude</b>
pAG424GPD_ ccdB-EGFP	HsMTMR2 Δ2-40	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	<b>Cette étude</b>
pAG424GPD_ ccdB-EGFP	HsMTMR2 Δ2-73	Amp ( <i>bla</i> )	TRP1	2μ	<i>GPD</i>	<b>Cette étude</b>

- Les plasmides de surexpression pVV200 (*TRP1*) et pVV214 (*URA3*) ont l'origine de répllication 2 $\mu$  et l'insert est placé sous le contrôle du promoteur fort *PGK* (Phosphoglycerate kinase).
- Les plasmides d'expression pVV204 (*TRP1*) et pVV208 (*URA3*) ont une origine de répllication CEN et l'insert est sous le contrôle du promoteur répressible par la tétracycline *TetO*.

Plasmides codant pour une protéine cargo fusionnée à un marqueur fluorescent :

Plasmide / Construction	Insert	Marqueur de sélection en bactéries	Marqueur de sélection en levures	Origine de répllication en levures	Promoteur	Source
pRS425	MET3-3xMyc-DsRed-FYVE	Amp ( <i>bla</i> )	LEU2	CEN		S. Emr
pFL38	Fur4-GFP	Amp ( <i>bla</i> )	URA3	CEN		J-M. Galan

## B. Plasmides de bactéries

Le gène codant pour MTM1 sauvage ou différents mutants ont été clonés par recombinaison dans le plasmide pGEX (Gateway™) créé à l'IGBMC (Illkirch), le plasmide résultant permettra de produire une protéine de fusion avec la GST (Glutathione-S-transférase).

Nom du plasmide	Type de plasmide	Marqueurs de sélection	Origine de répllication	Inserts
pSF10	pGEX	<i>Bla</i> (Amp <sup>r</sup> )	<i>ColE1 ori</i>	hMTM1_WT
pSF11	pGEX	<i>bla</i> (Amp <sup>r</sup> )	<i>ColE1 ori</i>	hMTM1_C375S
pSF12	pGEX	<i>bla</i> (Amp <sup>r</sup> )	<i>ColE1 ori</i>	hMTM1_V49F
pSF13	pGEX	<i>bla</i> (Amp <sup>r</sup> )	<i>ColE1 ori</i>	hMTM1_R69C
pJL3	pGEX	<i>bla</i> (Amp <sup>r</sup> )	<i>ColE1 ori</i>	GST-PH-GRAM WT
pJL4	pGEX	<i>bla</i> (Amp <sup>r</sup> )	<i>ColE1 ori</i>	GST-PH-GRAM VF
pJL5	pGEX	<i>bla</i> (Amp <sup>r</sup> )	<i>ColE1 ori</i>	GST-PH-GRAM RC
pDONR207	pDONR	<i>Gentamycine</i>	<i>pUC ori</i>	ccdB

#### **IV. Solutions et tampons courants**

**Tampon TAE 1x** : Tris 40 mM, acide acétique 20 mM, EDTA 1 mM, pH8.4

**Gel d'agarose 1%**: agarose 1%, BET 0,5 µg/L dans du tampon TAE 1x

**Tampon PBS 1x** : NaCl 154 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,05 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3mM, pH7.4

**Tampon PBS-Protéases inhibiteurs**: PBS 1x, inhibiteur de protéase (ROCHE Complete™ Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail™, une tablette pour 10 mL)

**Tampon d'élution Glutathione** : TrisHCl pH8 50 mM, Glutathione réduite 10 mM

**Tampon de lyse (levures)** : Hepes pH6.8 20 mM, KOAc 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Sorbitol 0,25 M, inhibiteur de protéase (ROCHE Complete™ Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail™, une tablette pour 10 mL)

**Tampon SBR 2x** : TrisHCl pH6.8 120 mM, SDS 4%, β-mercaptoethanol 4%, Glycerol 20 %, bleu de bromophénol 0,004%

**Gel de concentration SDS-PAGE** : acrylamide Rotiphorese 3%, TrisHCl pH6.8 125 mM, SDS 0,1 %, APS 0,1 %, TEMED 0,1 %

**Gel de séparation SDS-PAGE 10%** : acrylamide Rotiphorese 10%, TrisHCl pH8.8 375 mM, SDS 0,1 %, APS 0,1 %, TEMED 0,1 %

**Tampon TGS 10x** : Tris 30,28 g/L, Glycine 142,5 g/L, SDS 10 g/L

**Bleu de Coomassie** : Coomassie Blue Dye R250 0,1%, acide acétique 10%, éthanol 40%

**Tampon de transfert** : Tris 3 g/L, Glycine 14,4 g/L, SDS 0,1 g/L, éthanol absolu 20%

**Rouge Ponceau** : PonceauS 0,2%, acide acétique 3%

**Tampon PBS-T**: PBS 1x, Tween-20 0,1%

**Tampon de blocage** : PBS 1x, Tween-20 0,1%, lait écrémé en poudre 4%

**Tampon Hoffman** : Triton 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, TrisHCl pH8 10 mM, EDTA 1mM

**Tampon TE** : TrisHCl pH8 10 mM, EDTA 1 mM

**Tampon de transformation** : Polyéthylène glycol 4000 40%, AcOLi 0,1M, TrisHCl pH7.5 10mM, EDTA 1mM

**Tampon de réaction hMTM1** : Acétate d'ammonium 1 M + dithiothréitol pH6 0,2 mM

**Solution de dépôt pour TLC** : méthanol

**Solution de prétraitement TLC** : méthanol/eau (3/2) + oxalate de potassium 1%

**Solvant TLC** : (90:70:17:4) Chlorure de méthylène ; MeOH absolu ; eau ; hydroxyde d'ammonium concentré (ROTH, Rotipuran® Supra, 20%)

**V. Milieux**

**LB (Lysogeny Broth)** : Yeast Extract 5 g/L ; Tryptone 10 g/L , NaCl 10 g/L

**YPD** : Yeast Extract 10 g/L ; Peptone 20g/L ; Dextrose 20g/L

**SD (Synthetic Dextrose)** : Yeast Nitrogen base (sans acides aminés) 6,7 g/L ; Dextrose 20g/L

**SC – aa (Synthetic Complete – aa)** : SD + cocktails contenant tous les acides aminés sauf un ou deux (MP Biomedicals)

**Milieu acide oléique** : Yeast Extract 6 g/L ; Bactopeptone 10 g/L ; oléate 0,12 % ; Tween 20 0,2 % ; K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M 0,5 %)

N.B. Les milieux gélosés sont obtenus par ajout d’agar-agar à 20 g/L (EUROMEDEX)

**VI. Antibiotiques (concentration de travail)**

<b>Ampiciline</b>	100 µg/L	<b>Tetracycline</b>	12,5 µg/L
<b>Chloramphenicol</b>	36 µg/L	<b>Gentamycine</b>	7 µg/L
<b>Kanamycine</b>	25 µg/L	<b>G418</b>	167 µg/L

**VII. Anticorps**

Les anticorps utilisés au cours de ma thèse sont listés ci-dessous :

<b>Protéine ciblée</b>	<b>Dilution</b>	<b>Source</b>	<b>Produit dans</b>
Vps10	1/200 <sup>e</sup>	Molecular Probes	Souris
Vph1	1/1 000 <sup>e</sup>	Molecular Probes	Souris
Pgk1 22C5	1/100 <sup>e</sup>	Molecular Probes	Souris
hMTM1 1G6	1/10 000 <sup>e</sup>	J. Laporte (IGBMC)	Souris
hMTM1 R1208	1/2 000 <sup>e</sup>	J. Laporte (IGBMC)	Lapin
hMTM1 R2827	1/400 <sup>e</sup>	J. Laporte (IGBMC)	Lapin
hMTMR2 I-15	1/200 <sup>e</sup>	Santa Cruz	Souris
hMTMR2 4G6	1/500 <sup>e</sup>	AbNova	Souris
hMTMR12	0.5 µg/mL	H. Nandurkar	Lapin
hMTMR12	1/2 000 <sup>e</sup>	AbNova	Souris
Ape1	1/4 000 <sup>e</sup>	Dan Klionsky	Lapin
CPY	1/5 000 <sup>e</sup>	T. Aust, H. Riezman	Lapin
GFP	1/2 000 <sup>e</sup>	Molecular Probes	Lapin

## VIII. Conditions de culture

### A. Cultures bactériennes

Les cultures liquides bactériennes sont réalisées dans des tubes ou erlenmeyers stériles dans un incubateur à 37°C, sous agitation constante à 200 rpm, en présence, si nécessaire, de l'antibiotique approprié.

Les cultures sur milieu gélosé sont mises en croissance à 37°C, à l'exception de rares cas, selon les recommandations de fournisseurs.

### B. Cultures de levure

Les cultures liquides de levures sont réalisées dans des tubes ou erlenmeyers stériles dans un incubateur à 30°C, sous agitation constante à 200 rpm,

Les cultures solides sont réalisées sur boîte de Petri et incubées à 30°C.

## IX. Protocoles

### A. Purification des plasmides

2 mL de milieu LB + *antibiotique* sontensemencés avec une colonie bactérienne transformée et incubés durant la nuit à 37°C. Les culots bactériens sont récupérés après centrifugation à 2300xg pendant 5 min à 4°C. Les plasmides sont purifiés à l'aide du kit QIAprep® (Qiagen), selon le protocole préconisé par le fabricant, et leurs concentrations mesurées au moyen d'un spectrophotomètre NanoDrop® permettant une mesure optique à 260 nm avec 1 à 2 µL d'échantillon de 2 à 3700 ng/µL d'ADN bicaténaire.

### B. Digestions des plasmides et électrophorèse

Les digestions d'ADN plasmidiques sont réalisées selon les protocoles préconisés par les fabricants (New England Biolabs ou Fermentas FastDigest). Les échantillons sont déposés sur gel d'agarose 1% + BET 0,5 µg/L (dans du TAE 1x) en parallèle au marqueur de poids moléculaires (GeneRuler™ 1kb, Fermentas). L'électrophorèse est réalisée à 100V pendant 30 min dans du tampon TAE 1x. Un transilluminateur UV permettra la visualisation des bandes d'ADN révélées avec le BET.

### C. Préparation rapide de plasmides de levures

Les levures transformées sont mises en culture une nuit dans 2 mL de milieu sélectif maintenant la sélection des cellules transformées. Puis les cellules sont centrifugées 5 min à 2300xg et lavées dans du tampon TE. Le culot est repris dans 200 µL de tampon Hoffman et vortexé 2 min. On ajoute alors 150 µL de billes de verre 0,45 mm et 150 µL de phénol-chloroforme. Le mélange est vortexé pendant 2 min puis centrifugé 5 min à 15700xg. Le surnageant est lavé dans du chloroforme (vol/vol) et précipité avec 0,1 volume AcONa 3 M et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Le culot est lavé avec 1 mL d'éthanol 80% et centrifugé 8 min à 13400xg. Le culot final est repris dans 20 µL de tampon TE et conservé à -20°C.

### D. Transformations des bactéries électrocompétentes

Les bactéries sont transformées par électroporation. 40 µL de XL1-blue électrocompétentes sont incubées 5 min dans la glace avec 100 ng d'ADN plasmidique ou 2 µg d'ADN de levure. L'ensemble est transféré dans une cuve d'électroporation de 0,2 cm. L'électroporation est effectuée selon les paramètres suivants : voltage 2,5 kV, résistance 200 Ω, capacité 25 µF. Immédiatement après le choc électrique, 100 µL de LB sont ajoutés dans la cuve qui est replacée dans la glace avant d'étaler le mélange sur milieu sélectif LB+Amp. Les boîtes sont incubées à 37°C jusqu'à apparition de colonies.

### E. Transformations des bactéries chimiocompétentes

Les bactéries (BL21 – Rosetta, XL1 Blue, DH5α ou XL10-Gold) sont décongelées doucement dans la glace puis incubées 30 minutes dans la glace en présence d'environ 500 ng (1 à 3 µL) d'ADN (tapoter délicatement 2-3 fois pour resuspendre les cellules toutes les 10 minutes). Les tubes de bactéries sont alors plongés dans un bain-marie à 42°C pendant 30 secondes et immédiatement replacés dans la glace. On ajoute alors 300 µL de LB et on incube 10 minutes dans la glace avant de placer les tubes à 37°C pendant au moins 30 minutes. Enfin on étale les bactéries sur boîte contenant l'antibiotique adapté.

### F. Transformations des levures

Les levures sont mises en culture dans 10mL de milieu jusqu'à  $DO_{600} \approx 0.5 \sim 0.6$  puis centrifugées à 2300xg pendant 2 minutes. Le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans 50 µL d'eau. Dans un nouvel eppendorf, ajouter 10µL de sperme de saumon (10µg/µL). Ajouter les 50µL de cellules et bien resuspendre à la pipette. Ajouter le plasmide à transformer (500-1000 ng). Ajouter 350µL de tampon de transformation et

vortexer brièvement. Incuber à 42°C au bain-marie pendant 30 à 40 minutes. Ajouter 1 mL d'eau stérile au milieu de transformation et centrifuger 5 minutes à 2000 x g. Eliminer le surnageant et resuspendre à la pipette dans 100 µL d'eau stérile. Etaler sur boîte maintenant la sélection.

## **G. Production et purification de hMTM1 fusionnée à la GST**

### **1. Production de GST-MTM1**

200 mL de culture LB+Amp+Cam sontensemencés avec des bactéries *Rosetta*<sup>TM</sup> transformées par les plasmides pSF10-13. Le milieu est incubé à 37°C jusqu'à DO<sub>600</sub>=0.5-0.6, puis la production de protéines de fusion avec la GST (sous le contrôle de l'opéron lactose) est induite par ajout de 0,5 mM final d'IPTG, un analogue non métabolisable du galactose. Les cultures sont alors incubées progressivement de 37°C à 16°C, température à laquelle elles sont incubées durant une nuit, puis centrifugées 10 min à 4500xg à 4°C. Le culot est lavé dans 10 mL de PBS 1x et repris dans 2 mL de tampon PBS+Protéases inhibiteurs. La lyse est réalisée dans la glace par sonication à raison de 3 cycles de lyses de 30 secondes à 28%, avec 30 secondes de pause entre chaque cycle. L'extrait est clarifié par centrifugation à 15700xg pendant 15 min à 4°C. Le surnageant soit l'extrait protéique bactérien total est récupéré et conservé à 4°C.

### **2. Purification de GST-hMTM1 par chromatographie d'affinité**

L'extrait protéique total est incubé en présence de 50 µL de billes Glutathione-Sepharose (GE Healthcare) préalablement lavées 3 fois avec du PBS 1x. Le volume est ajusté à 5 mL avec du tampon PBS+Protéases inhibiteurs et les tubes sont incubés sous agitation douce sur une roue à 4°C pendant une nuit. Les billes sont ensuite centrifugées 5 min à 800xg à 4°C (50 µL du lysat total est conservé à 4°C) et lavées 5 fois avec 1 mL PBS+Protéases inhibiteurs. L'élution se fait par ajout de 50 µL de tampon d'élution Glutathione sur les billes et incubation 20 min à température ambiante sans agitation. Une première centrifugation de 5 min à 800xg à 4°C permettra de récupérer un premier éluat. L'opération est effectuée deux fois de plus. Les 3 éluats sont séparés par SDS-PAGE. Le gel de polyacrylamide est coloré au bleu de Coomassie afin de vérifier la pureté des échantillons. La concentration protéique des éluats et de toutes les solutions de protéines dans cette étude est déterminée par un dosage colorimétrique (DO 595 nm) dérivé de la méthode Bradford, nommé Biorad Protein Assay (Biorad).

## H. Préparation d'extraits protéiques totaux de levures

200 mL de milieu de culture sontensemencés avec les levures et incubés à 30°C jusqu'à  $DO_{600}$  0.5-0.8 en milieu complet YPG ou 1.0-1.2 en milieu minimum SC-ura ou SC-trp. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 4500xg pendant 10 min à 4°C puis le culot est lavé dans 10 mL de tampon de lyse froid. Le culot est repris dans 1 mL de tampon de lyse froid et transféré dans un tube 2 mL (capuchon à visser) contenant l'équivalent de 1 mL de billes de verre 0,45 mm. Les cellules sont lysées par cinq cycles de 30 sec d'agitation forte (puissance de 6.5 M/S) dans une FASTprep® (MP Biomedical) avec des pauses de 4 min dans la glace entre chaque cycle. Le lysat est récupéré en réalisant une légère incision au fond du tube de lyse puis en l'emboîtant dans un tube Eppendorf™ 1,5 mL et enfin en centrifugeant 10 min à 500xg (Fig. 5). Ceci permet de récupérer la quasi-totalité du lysat. La concentration protéique est déterminée par dosage Biorad Protein Assay. Le lysat est conservé à 4°C (ou à -20°C pour une conservation plus longue).

## I. Western Blot et immunomarquage

### 1. Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

La partie haute du gel comprenant les puits constitue le gel de concentration, la partie inférieure correspond au gel de séparation, au travers duquel les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire. Avant le dépôt, les protéines sont dénaturées dans du tampon SBR 1x final à 95°C pendant 10 min. La migration est faite à 200V pendant 50 min dans du tampon TGS 1x.

### 2. Electrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Le transfert du gel sur une membrane de nitrocellulose (Protran BA85) se fait en milieu liquide à 100V dans du tampon de transfert pendant environ 1h30 selon la technique du « sandwich ».

### 3. Coloration des membranes au rouge Ponceau

Après le transfert, la membrane de nitrocellulose est incubée 10 min dans du Rouge Ponceau. Ce colorant des protéines n'affecte pas l'immunodétection. Un rinçage à l'eau milliQ élimine l'excès de colorant et révèle les protéines (seuil de détection  $\approx$  250 ng).



#### 4. Immunodétection

Suite au transfert, la membrane est saturée en protéines par incubation dans le tampon de blocage pendant 2h30 à température ambiante. Puis la membrane est incubée 1h à température ambiante (ou une nuit à 4°C) avec les anticorps primaires dilués (voir 2.11) dans du tampon PBS-T. La membrane est rincée à trois reprises 10 min dans du tampon PBS-T et incubée 1h à température ambiante avec les anticorps secondaires anti-mouse Ig (GE Healthcare) couplés à la peroxydase HRP (ECL) ou la phosphatase alcaline (ECF). Trois séries de lavages de 10 min dans du tampon PBS-T sont à nouveau réalisés avant révélation par une réaction de chimioluminescence ou de chimiofluorescence (kit ECL Plus ou ECF, GE Healthcare). La réaction enzymatique de la HRP génère une émission de lumière qui va imprimer un film d'autoradiographie révélé manuellement en chambre noire. La réaction enzymatique de la phosphatase alcaline génère de la fluorescence à partir d'un réactif chimique qui sera révélé par scanner aux U.V.

#### J. Fractionnement subcellulaire

Les lysats totaux de levures sont soumis à une série de centrifugations à vitesses croissantes. A l'issue de chaque centrifugation, le culot sera récupéré et le surnageant soumis à une centrifugation supplémentaire à plus grande vitesse. Ainsi, les fractions correspondront chacune à un assortiment hétérogène de membranes plus ou moins lourdes, ayant culottées à des vitesses différentes. La présence des différentes isoformes de hMTM1 sera testée par western-blot et immunodétection dans les différentes fractions obtenues. Pour le fractionnement subcellulaire, l'extrait protéique total (voir 2.8) est clarifié par une nouvelle centrifugation de 5min à 500xg à 4°C. Ce surnageant est récolté et centrifugé à 13000xg pour 10 min à 4°C. Le culot résultant **P13** est conservé et repris dans 100 µL de tampon PBS-protéase inhibiteur. Le surnageant S13 est centrifugé à 100 000xg pour 1h à 4°C (Fig. 5). Le surnageant résultant **S100** est conservé et le culot **P100** repris dans 100 µL de tampon PBS-protéase inhibiteur. La concentration protéique de chaque échantillon (**P13**, **P100**, **S100**) est déterminée par dosage protéique, et l'équivalent de 60 µg de protéines totales est séparé par électrophorèse SDS-PAGE 10% et analysé par Western blot avec les anticorps suivant.

#### K. Réaction enzymatique *in vitro* avec hMTM1

La réaction enzymatique est réalisée en présence de phosphoinositides fluorescents (BODIPY<sup>®</sup>-FL PIP<sub>n</sub>S, C<sub>6</sub>, Echelon). Le milieu de réaction se compose de 3 µL de FL-PIs

(stock à 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 1 $\mu\text{g}$ , 2 $\mu\text{g}$  ou 5 $\mu\text{g}$  (selon l'expérience) de protéines purifiées GST-hMTM1 et 10  $\mu\text{L}$  de tampon de réaction hMTM1. Le mélange réactionnel est incubé 90 min au bain-marie à 30°C puis 100  $\mu\text{L}$  d'acétone froid sont ajoutés pour stopper la réaction. Enfin, le mélange est soumis à un séchage par évaporation au moyen d'un SpeedVac evaporator jusqu'à l'obtention d'un produit de réaction sec.

### **L. Chromatographie sur couche mince (TLC)**

Les résidus de réaction secs sont repris dans 7  $\mu\text{L}$  de solution de dépôt. Les échantillons sont ensuite déposés en ligne à environ 3 cm du bas d'une plaque de chromatographie en couche mince de silice (MERCK TLC Silica Gel60 F<sub>254</sub> 20x20cm) prétraitée par un bain dans la solution de prétraitement TLC. La plaque est alors trempée verticalement dans un bain de 2 cm de profondeur de solvant de migration. La migration s'effectue au sein d'une cuve hermétique afin de saturer l'atmosphère de la chambre en solvant. La migration est stoppée lorsque le front du solvant parvient environ à mi-hauteur de la plaque. Un transilluminateur UV permettra la visualisation des bandes de FL-PIs fluorescents.

### **M. Microscopie**

Un volume de 2.5  $\mu\text{L}$  de milieu de culture de levures en phase exponentielle de croissance ( $\text{DO}_{600}$  0.6-0.8) avec ou sans stress osmotique (10 min d'incubation après ajout au milieu de NaCl 0.4 M final) est directement placé entre lame et lamelle (2x2 cm). Les cellules vivantes sont observées au microscope à fluorescence AxioVert200 (Zeiss), objectif 100x (ouverture 1,45), filtre DIC (Differential Interference Contrast), lumière halogène pour voir les cellules en contraste différentiel Nomarski. Les images sont capturées par une caméra monochrome refroidie CoolSnapHQ (Roper Scientific) à l'aide du logiciel AxioVision (Zeiss). Elles sont traitées par le logiciel Adobe Photoshop CS2.

### **N. Temps de récupération après un stress hyperosmotique**

2 unités de  $\text{DO}_{600}$  de cellules en phase exponentielle de croissance ont été récoltées, centrifugées 5 minutes à 1,800xg et resuspendues dans 82  $\mu\text{L}$  de milieu YPD. 18  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M (concentration finale  $\approx$  0.9 M) ont été ajoutés, puis les cellules sont réincubées pendant 10 minutes à 30°C. 50  $\mu\text{L}$  sont prélevés pour observation au microscope et les 50  $\mu\text{L}$  restant sont

centrifugés à 1,800xg pendant 5 minutes, resuspendus dans 50  $\mu$ L de YPD et réincubés à 30°C pendant 10 minutes.

#### **O. Marquage des cellules au FM4-64**

2 unités de  $DO_{600}$  de cellules en phase exponentielle de croissance ont été récoltées, centrifugées 5 minutes à 1,800xg et resuspendues dans 30  $\mu$ L de milieu YPD. Puis le FM4-64 est ajouté à une concentration finale de 24 $\mu$ M. Les cellules sont alors incubées pendant 15 minutes à température ambiante à l'obscurité avant d'être placée dans la glace en vue d'une observation microscopique.

#### **P. Marquage des cellules au Lucifer Yellow**

Les cultures de levures en phase exponentielle de croissance sont centrifugées 5 minutes à 1,800xg. Le culot est resuspendu dans du YPD additionné de 10 $\mu$ L de Lucifer Yellow (LY) à une concentration finale de 20 mg/mL. Le processus d'endocytose est réalisé à 30°C pendant 1h30. Puis les cellules sont lavées 4 fois dans un tampon NaPO<sub>4</sub> 50mM, NaN<sub>3</sub> 10mM avant d'être observées au microscope à fluorescence. L'observation est faite à l'objectif 100X (Zeiss,  $\infty/0,17$ ) sur un microscope axiovert200 (Zeiss) équipé de filtres GFP, DAPI et rhodamine et d'une système de contraste interdifférentiel de phase (DIC). Les images sont enregistrées par une camera Coolsnap HQ photometrix et traitées par le logiciel Photoshop CS2.

#### **Q. Induction de la synthèse et de l'endocytose de Fur4**

Les levures transformées avec le plasmide pRS525\_Fur4-GFP sont diluées à  $DO_{600nm} \approx 0,5$  dans du milieu 2% raffinose supplémenté de 0,05% de glucose jusqu'en phase exponentielle de croissance. Après 4 à 5 heures en milieu 2% raffinose + 0,05% glucose, l'induction de la production de Fur4-GFP est réalisée par ajout de Galactose à une concentration finale de 2% et les cultures sont réincubées 2h à 30°C sous agitation. On arrête la synthèse de Fur4-GFP par ajout de glucose à une concentration finale de 2% et incubation 5 à 15 minutes à 30°C. Puis un aliquot est prélevé, centrifugé et observé au microscope pour constituer le temps 0min

juste avant l'ajout de cycloheximide à 100 µg/mL finale dans les cultures. Un aliquot est prélevé toutes les 30 minutes pour observation microscopique.

### R. colimmunoprécipitation

Le protocole est identique à celui présenté pour l'immunoprécipitation de MTM1 (voir « Materials & Methods » de l'article). Puis les fractions purifiées ont été analysées par SDS-PAGE et immunodétectées en utilisant des anticorps anti-MTM1 1G6, anti-MTMR12, anti-Pgk1 et anti-Vps10.

## X. Oligonucléotides utilisés pour le clonage

### A. Oligonucléotides « Forward »

Nom	Séquence	Cible	Objectif de l'amplification
MTMR12_F	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC <b>ATG CTG GGG AAA</b> <b>GGA GTA GTC GG</b>	MTMR12	
MTMR2_F	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG <b>GAG AAG AGC</b> <b>TCG AGC TGC G</b>	MTMR12	
MTMR2_F_delta2-24	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG <b>TTG TCC AGT</b> <b>GCC TCC ACT TCT C</b>	MTMR2	MTMR2 délétée Δ2-24
MTMR2_F_delta2-40	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG <b>TCA GCT TCT</b> <b>GTT GTA TCA TCA G</b>	MTMR2	MTMR2 délétée Δ2-40
MTMR2_F_delta2-74	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG <b>GAA GAA CCA</b> <b>CCC TTG CTT CCA GG</b>	MTMR2	MTMR2 délétée Δ2-73
MTM1_F	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG <b>GCT TCT GCA</b> <b>TCA ACT TC</b>	MTM1	
MTM1_deltaPG/G	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG <b>CTG CCA TTA</b> <b>TTT GCA TTT TTA AAT G</b>	MTM1	MTM1 délétée pour le PH/G
Ymr1_F	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG <b>GAG TAC ATC</b> <b>AAG ATT GCC</b>	Ymr1	

## B. Oligonucléotides « Reverse »

Nom	Séquence	Cible	Objectif de l'amplification
MTMR12_R_noSTOP	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CAC ATC CCC TAG GTC CAC G	MTMR12	MTMR12 sans codon STOP
MTMR12_R_withSTOP	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC <b>TCA</b> CAC ATC CCC TAG GTC CAC G	MTMR12	MTMR12 avec codon STOP
MTMR2_R_noSTOP	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TAC AAC AGT TTG GAC AGG	MTMR2	MTMR2 sans codon STOP
MTMR2_R_withSTOP	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA TAC AAC AGT TTG GAC AGG	MTMR2	MTMR2 avec codon STOP
MTM1_R_noSTOP	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GAA GTG AGT TTG CAC ATG G	MTM1	MTM1 sans codon STOP
MTM1_R_WithSTOP	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCA GAA GTG AGT TTG CAC ATG G	MTM1	MTM1 avec codon STOP
PH/G_R_noSTOP (aa1-170)	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CAC TGG ATT GTA AAC TGT CCA TCC	MTM1	PH/G sans codon STOP
PH/G_R_withSTOP (aa1-170)	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCA CAC TGG ATT GTA AAC TGT CCA TCC	MTM1	PH/G avec codon STOP
Ymr1_R_noSTOP	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTT TCT ATT AAA CAT ATC AAA TCC	Ymr1	Ymr1 sans codon STOP
Ymr1_R_withSTOP	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCA CTT TCT ATT AAA CAT ATC AAA TCC	Ymr1	Ymr1 avec codon STOP

N.B. Les amplifications sans codon STOP permettent de fusionner les protéines en C-ter.

## C. Paramètres d'amplification par PCR

Pour mes amplifications d'ADN par PCR, la polymérase Phusion de FINNZYMES a été utilisée. Les mélanges réactionnels ont été réalisés selon les recommandations du fabricant et l'amplification est effectuée dans un thermocycleur Eppendorf™ « mastercycler personnel ».

Etape du cycle	Température	Durée de l'étape	Nombre de répétitions
Dénaturation initiale	98°C	30 secondes	1X
Dénaturation	98°C	7 secondes	30X
Hybridation	57°C	30 secondes	
Extension	72°C	30 secondes	
Extension finale	72°C	7 minutes	1X
Conservation des échantillons	4°C	∞	





## ❖ REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., Hamilton, S.R., *et al.* (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science (New York, NY)* *260*, 812-816.
- Aartsma-Rus, A. (2012). Overview on DMD Exon Skipping. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* *867*, 97-116.
- Aasland, R., Gibson, T.J., and Stewart, A.F. (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends in biochemical sciences* *20*, 56-59.
- Achstetter, T., Emter, O., Ehmann, C., and Wolf, D.H. (1984). Proteolysis in eukaryotic cells. Identification of multiple proteolytic enzymes in yeast. *The Journal of biological chemistry* *259*, 13334-13343.
- Adkin, C.F., Meloni, P.L., Fletcher, S., Adams, A.M., Muntoni, F., Wong, B., and Wilton, S.D. (2011). Multiple exon skipping strategies to by-pass dystrophin mutations. *Neuromuscul Disord* *22*, 297-305.
- Al-Qusairi, L., and Laporte, J. (2011). T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skeletal muscle* *1*, 26.
- Alcazar-Roman, A.R., and Wente, S.R. (2008). Inositol polyphosphates: a new frontier for regulating gene expression. *Chromosoma* *117*, 1-13.
- Alvarez-Venegas, R., and Avramova, Z. (2002). SET-domain proteins of the Su(var)3-9, E(z) and trithorax families. *Gene* *285*, 25-37.
- Anderson, K.E., and Jackson, S.P. (2003). Class I phosphoinositide 3-kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology* *35*, 1028-1033.
- Antonsson, B.E. (1994). Purification and characterization of phosphatidylinositol synthase from human placenta. *The Biochemical journal* *297 (Pt 3)*, 517-522.
- Arcaro, A., Volinia, S., Zvelebil, M.J., Stein, R., Watton, S.J., Layton, M.J., Gout, I., Ahmadi, K., Downward, J., and Waterfield, M.D. (1998). Human phosphoinositide 3-kinase C2beta, the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity. *The Journal of biological chemistry* *273*, 33082-33090.
- Audhya, A., and Emr, S.D. (2002). Stt4 PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP kinase cascade. *Developmental cell* *2*, 593-605.
- Audhya, A., and Emr, S.D. (2003). Regulation of PI4,5P2 synthesis by nuclear-cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. *The EMBO journal* *22*, 4223-4236.
- Audhya, A., Foti, M., and Emr, S.D. (2000). Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics. *Molecular biology of the cell* *11*, 2673-2689.
- Azzedine, H., Bolino, A., Taieb, T., Birouk, N., Di Duca, M., Bouhouche, A., Benamou, S., Mrabet, A., Hammadouche, T., Chkili, T., *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.
- Bach, S., Talarek, N., Andrieu, T., Vierfond, J.M., Mettey, Y., Galons, H., Dormont, D., Meijer, L., Cullin, C., and Blondel, M. (2003). Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* *21*, 1075-1081.
- Bach, S., Tribouillard, D., Talarek, N., Desban, N., Gug, F., Galons, H., and Blondel, M. (2006). A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions. *Methods (San Diego, Calif)* *39*, 72-77.
- Backer, J.M. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *The Biochemical journal* *410*, 1-17.
- Bassett, D.E., Jr., Boguski, M.S., and Hieter, P. (1996). Yeast genes and human disease. *Nature* *379*, 589-590.
- Beggs, A.H., Bohm, J., Snead, E., Kozlowski, M., Maurer, M., Minor, K., Childers, M.K., Taylor, S.M., Hitte, C., Mickelson, J.R., *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, M.J., Taylor, G.S., Brock, M.A., Ghosh, P., Woods, V.L., and Dixon, J.E. (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, M.J., Taylor, G.S., Kim, S.A., Veine, D.M., Dixon, J.E., and Stuckey, J.A. (2003). Crystal structure of a phosphoinositide phosphatase, MTMR2: insights into myotubular myopathy and Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Molecular cell* *12*, 1391-1402.
- Berger, P., Berger, I., Schaffitzel, C., Tersar, K., Volkmer, B., and Suter, U. (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, P., Bonneick, S., Willi, S., Wymann, M., and Suter, U. (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.
- Berger, P., Schaffitzel, C., Berger, I., Ban, N., and Suter, U. (2003). Membrane association of myotubularin-related protein 2 is mediated by a pleckstrin homology-GRAM domain and a coiled-coil dimerization module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 12177-12182.
- Berridge, M.J. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* *1793*, 933-940.
- Berridge, M.J., and Irvine, R.F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* *312*, 315-321.
- Bevilacqua, J.A., Bitoun, M., Biancalana, V., Oldfors, A., Stoltenburg, G., Claeys, K.G., Lacene, E., Brochier, G., Manere, L., Laforet, P., *et al.* (2009). "Necklace" fibers, a new histological marker of late-onset MTM1-related centronuclear myopathy. *Acta neuropathologica* *117*, 283-291.
- Biancalana, V., Caron, O., Gallati, S., Baas, F., Kress, W., Novelli, G., D'Apice, M.R., Lagier-Tourenne, C., Buj-Bello, A., Romero, N.B., *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.
- Bilodeau, P.S., Urbanowski, J.L., Winistorfer, S.C., and Piper, R.C. (2002). The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nature cell biology* *4*, 534-539.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* *37*, 911-917.
- Blondeau, F., Laporte, J., Bodin, S., Superti-Furga, G., Payrastre, B., and Mandel, J.L. (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, A., Bolis, A., Previtali, S.C., Dina, G., Bussini, S., Dati, G., Amadio, S., Del Carro, U., Mruk, D.D., Feltri, M.L., *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, A., Marigo, V., Ferrera, F., Loader, J., Romio, L., Leoni, A., Di Duca, M., Cinti, R., Cecchi, C., Feltri, M.L., *et al.* (2002). Molecular characterization and expression analysis of *Mtmr2*, mouse homologue of MTMR2, the Myotubularin-related 2 gene, mutated in CMT4B. *Gene* *283*, 17-26.
- Bolino, A., Muglia, M., Conforti, F.L., LeGuern, E., Salih, M.A., Georgiou, D.M., Christodoulou, K., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Mandich, P., Schenone, A., *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, A., Coviello, S., Bussini, S., Dina, G., Pardini, C., Previtali, S.C., Malaguti, M., Morana, P., Del Carro, U., Feltri, M.L., *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. *J Neurosci* *25*, 8567-8577.
- Bolis, A., Coviello, S., Visigalli, I., Taveggia, C., Bachi, A., Chishti, A.H., Hanada, T., Quattrini, A., Previtali, S.C., Biffi, A., *et al.* (2009). *Dlg1*, *Sec8*, and *Mtmr2* regulate membrane homeostasis in Schwann cell myelination. *J Neurosci* *29*, 8858-8870.

- Bonangelino, C.J., Catlett, N.L., and Weisman, L.S. (1997). Vac7p, a novel vacuolar protein, is required for normal vacuole inheritance and morphology. *Molecular and cellular biology* 17, 6847-6858.
- Bonangelino, C.J., Nau, J.J., Duex, J.E., Brinkman, M., Wurmser, A.E., Gary, J.D., Emr, S.D., and Weisman, L.S. (2002). Osmotic stress-induced increase of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate requires Vac14p, an activator of the lipid kinase Fab1p. *The Journal of cell biology* 156, 1015-1028.
- Botelho, R.J. (2009). Changing phosphoinositides "on the fly": how trafficking vesicles avoid an identity crisis. *Bioessays* 31, 1127-1136.
- Botstein, D., Chervitz, S.A., and Cherry, J.M. (1997). Yeast as a model organism. *Science (New York, NY)* 277, 1259-1260.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast (Chichester, England)* 14, 115-132.
- Brown, H.A., Gutowski, S., Moomaw, C.R., Slaughter, C., and Sternweis, P.C. (1993). ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* 75, 1137-1144.
- Buj-Bello, A., Biancalana, V., Moutou, C., Laporte, J., and Mandel, J.L. (1999). Identification of novel mutations in the MTM1 gene causing severe and mild forms of X-linked myotubular myopathy. *Human mutation* 14, 320-325.
- Buj-Bello, A., Fougerousse, F., Schwab, Y., Messaddeq, N., Spehner, D., Pierson, C.R., Durand, M., Kretz, C., Danos, O., Douar, A.M., *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, A., Laugel, V., Messaddeq, N., Zahreddine, H., Laporte, J., Pellissier, J.F., and Mandel, J.L. (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.
- Bultsma, Y., Keune, W.J., and Divecha, N. (2010). PIP4Kbeta interacts with and modulates nuclear localization of the high-activity PtdIns5P-4-kinase isoform PIP4Kalpha. *The Biochemical journal* 430, 223-235.
- Bunce, M.W., Boronenkov, I.V., and Anderson, R.A. (2008). Coordinated activation of the nuclear ubiquitin ligase Cul3-SPOP by the generation of phosphatidylinositol 5-phosphate. *The Journal of biological chemistry* 283, 8678-8686.
- Bunce, M.W., Gonzales, M.L., and Anderson, R.A. (2006). Stress-ING out: phosphoinositides mediate the cellular stress response. *Sci STKE* 2006, pe46.
- Caldwell, K.K., Lips, D.L., Bansal, V.S., and Majerus, P.W. (1991). Isolation and characterization of two 3-phosphatases that hydrolyze both phosphatidylinositol 3-phosphate and inositol 1,3-bisphosphate. *The Journal of biological chemistry* 266, 18378-18386.
- Cao, C., Laporte, J., Backer, J.M., Wandinger-Ness, A., and Stein, M.P. (2007). Myotubularin lipid phosphatase binds the hVPS15/hVPS34 lipid kinase complex on endosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8, 1052-1067.
- Charcot, J., and Marie, P. (1886). Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive souvent familiale débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Revue de Médecine* 6, 97-138.
- Choudhury, P., Srivastava, S., Li, Z., Ko, K., Albaum, M., Narayan, K., Coetzee, W.A., Lemmon, M.A., and Skolnik, E.Y. (2006). Specificity of the myotubularin family of phosphatidylinositol-3-phosphatase is determined by the PH/GRAM domain. *The Journal of biological chemistry* 281, 31762-31769.
- Chow, C.Y., Zhang, Y., Dowling, J.J., Jin, N., Adamska, M., Shiga, K., Szigeti, K., Shy, M.E., Li, J., Zhang, X., *et al.* (2007). Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature* 448, 68-72.
- Clague, M.J., and Lorenzo, O. (2005). The myotubularin family of lipid phosphatases. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 6, 1063-1069.

- Clarke, J.H., Letcher, A.J., D'Santos C, S., Halstead, J.R., Irvine, R.F., and Divecha, N. (2001). Inositol lipids are regulated during cell cycle progression in the nuclei of murine erythroleukaemia cells. *The Biochemical journal* 357, 905-910.
- Cockcroft, S. (1998). Phosphatidylinositol transfer proteins: a requirement in signal transduction and vesicle traffic. *Bioessays* 20, 423-432.
- Cockcroft, S., Ball, A., Fensome, A., Hara, S., Jones, D., Prosser, S., and Swigart, P. (1997). Phosphatidylinositol transfer proteins: an essential requirement in inositol lipid signalling. *Biochemical Society transactions* 25, 1125-1131.
- Cooke, F.T., Dove, S.K., McEwen, R.K., Painter, G., Holmes, A.B., Hall, M.N., Michell, R.H., and Parker, P.J. (1998). The stress-activated phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase Fab1p is essential for vacuole function in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 8, 1219-1222.
- Coronas, S., Lagarrigue, F., Ramel, D., Chicanne, G., Delsol, G., Payrastre, B., and Tronchere, H. (2008). Elevated levels of PtdIns5P in NPM-ALK transformed cells: implication of PIKfyve. *Biochemical and biophysical research communications* 372, 351-355.
- Cossart, P. (2004). Bacterial invasion: a new strategy to dominate cytoskeleton plasticity. *Developmental cell* 6, 314-315.
- Couplan, E., Aiyar, R.S., Kucharczyk, R., Kabala, A., Ezkurdia, N., Gagneur, J., St Onge, R.P., Salin, B., Soubigou, F., Le Cann, M., *et al.* (2011). A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 11989-11994.
- Cozier, G.E., Carlton, J., Bouyoucef, D., and Cullen, P.J. (2004). Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Phosphoinositides in Subcellular Targeting and Enzyme Activation*, H Stenmark ed 282, 49-88.
- Cui, X., De Vivo, I., Slany, R., Miyamoto, A., Firestein, R., and Cleary, M.L. (1998). Association of SET domain and myotubularin-related proteins modulates growth control. *Nature genetics* 18, 331-337.
- Daboussi, L., Costaguta, G., and Payne, G.S. (2012). Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network. *Nature cell biology* 14, 239-248.
- De Camilli, P., Emr, S.D., McPherson, P.S., and Novick, P. (1996). Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science (New York, NY)* 271, 1533-1539.
- de Gouyon, B.M., Zhao, W., Laporte, J., Mandel, J.L., Metzzenberg, A., and Herman, G.E. (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, M., Godi, A., and Corda, D. (2002). Phosphoinositides and the golgi complex. *Current opinion in cell biology* 14, 434-447.
- De Matteis, M.A., Di Campli, A., and D'Angelo, G. (2007). Lipid-transfer proteins in membrane trafficking at the Golgi complex. *Biochimica et biophysica acta* 1771, 761-768.
- De Matteis, M.A., and Godi, A. (2004). PI-loting membrane traffic. *Nature cell biology* 6, 487-492.
- Desrivieres, S., Cooke, F.T., Parker, P.J., and Hall, M.N. (1998). MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 273, 15787-15793.
- Dewitt, S., Tian, W., and Hallett, M.B. (2006). Localised PtdIns(3,4,5)P3 or PtdIns(3,4)P2 at the phagocytic cup is required for both phagosome closure and Ca<sup>2+</sup> signalling in HL60 neutrophils. *Journal of cell science* 119, 443-451.
- Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651-657.
- Di Paolo, G., Moskowitz, H.S., Gipson, K., Wenk, M.R., Voronov, S., Obayashi, M., Flavell, R., Fitzsimonds, R.M., Ryan, T.A., and De Camilli, P. (2004). Impaired PtdIns(4,5)P2 synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking. *Nature* 431, 415-422.
- Doerks, T., Strauss, M., Brendel, M., and Bork, P. (2000). GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. *Trends in biochemical sciences* 25, 483-485.
- Donaldson, J.G. (2005). Arfs, phosphoinositides and membrane traffic. *Biochemical Society transactions* 33, 1276-1278.

- Donaldson, J.G., Honda, A., and Weigert, R. (2005). Multiple activities for Arf1 at the Golgi complex. *Biochimica et biophysica acta* 1744, 364-373.
- Dove, S.K., Cooke, F.T., Douglas, M.R., Sayers, L.G., Parker, P.J., and Michell, R.H. (1997). Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* 390, 187-192.
- Dove, S.K., Dong, K., Kobayashi, T., Williams, F.K., and Michell, R.H. (2009). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate and Fab1p/PIKfyve under PPI<sub>n</sub> endo-lysosome function. *The Biochemical journal* 419, 1-13.
- Dove, S.K., McEwen, R.K., Mayes, A., Hughes, D.C., Beggs, J.D., and Michell, R.H. (2002). Vac14 controls PtdIns(3,5)P(2) synthesis and Fab1-dependent protein trafficking to the multivesicular body. *Curr Biol* 12, 885-893.
- Dove, S.K., Piper, R.C., McEwen, R.K., Yu, J.W., King, M.C., Hughes, D.C., Thuring, J., Holmes, A.B., Cooke, F.T., Michell, R.H., *et al.* (2004). Svp1p defines a family of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate effectors. *The EMBO journal* 23, 1922-1933.
- Dowling, J.J., Vreede, A.P., Low, S.E., Gibbs, E.M., Kuwada, J.Y., Bonnemann, C.G., and Feldman, E.L. (2009). Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS genetics* 5, e1000372.
- Duex, J.E., Nau, J.J., Kauffman, E.J., and Weisman, L.S. (2006a). Phosphoinositide 5-phosphatase Fig 4p is required for both acute rise and subsequent fall in stress-induced phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate levels. *Eukaryotic cell* 5, 723-731.
- Duex, J.E., Tang, F., and Weisman, L.S. (2006b). The Vac14p-Fig4p complex acts independently of Vac7p and couples PI3,5P2 synthesis and turnover. *The Journal of cell biology* 172, 693-704.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., *et al.* (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35-44.
- Efe, J.A., Botelho, R.J., and Emr, S.D. (2007). Atg18 regulates organelle morphology and Fab1 kinase activity independent of its membrane recruitment by phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate. *Molecular biology of the cell* 18, 4232-4244.
- Ellis, S., and Mellor, H. (2000). Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends in cell biology* 10, 85-88.
- Erdman, S., Lin, L., Malczynski, M., and Snyder, M. (1998). Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. *The Journal of cell biology* 140, 461-483.
- Erneux, C., Edimo, W.E., Deneubourg, L., and Pirson, I. (2011). SHIP2 multiple functions: a balance between a negative control of PtdIns(3,4,5)P level, a positive control of PtdIns(3,4)P production, and intrinsic docking properties. *Journal of cellular biochemistry* 112, 2203-2209.
- Estela, A., Pla-Martin, D., Sanchez-Piris, M., Sesaki, H., and Palau, F. (2011). Charcot-Marie-Tooth-related gene GDAP1 complements cell cycle delay at G2/M phase in *Saccharomyces cerevisiae* fis1 gene-defective cells. *The Journal of biological chemistry* 286, 36777-36786.
- Eugster, A., Pecheur, E.I., Michel, F., Winsor, B., Letourneur, F., and Friant, S. (2004). Ent5p is required with Ent3p and Vps27p for ubiquitin-dependent protein sorting into the multivesicular body. *Molecular biology of the cell* 15, 3031-3041.
- Falasca, M., and Maffucci, T. (2006). Emerging roles of phosphatidylinositol 3-monophosphate as a dynamic lipid second messenger. *Archives of physiology and biochemistry* 112, 274-284.
- Fidani, L., Karagianni, P., Tsakalidis, C., Mitsiako, G., Hatzioannidis, I., Biancalana, V., and Nikolaidis, N. (2011). Identification of a mutation in the MTM1 gene, associated with X-linked myotubular myopathy, in a Greek family. *Hippokratia* 15, 278-279.
- Firestein, R., and Cleary, M.L. (2001). Pseudo-phosphatase Sbf1 contains an N-terminal GEF homology domain that modulates its growth regulatory properties. *Journal of cell science* 114, 2921-2927.
- Firestein, R., Nagy, P.L., Daly, M., Huie, P., Conti, M., and Cleary, M.L. (2002). Male infertility, impaired spermatogenesis, and azoospermia in mice deficient for the pseudophosphatase Sbf1. *The Journal of clinical investigation* 109, 1165-1172.
- Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M., and Kolodner, R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 1027-1038.

- Ford, M.G., Pearse, B.M., Higgins, M.K., Vallis, Y., Owen, D.J., Gibson, A., Hopkins, C.R., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2001). Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science (New York, NY)* *291*, 1051-1055.
- Foury, F. (1997). Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* *195*, 1-10.
- Foury, F., and Kucej, M. (2002). Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr Opin Chem Biol* *6*, 106-111.
- Friant, S., Pecheur, E.I., Eugster, A., Michel, F., Lefkir, Y., Nourrisson, D., and Letourneur, F. (2003). Ent3p Is a PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> effector required for protein sorting to the multivesicular body. *Developmental cell* *5*, 499-511.
- Fujiki, Y., Fowler, S., Shio, H., Hubbard, A.L., and Lazarow, P.B. (1982). Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *The Journal of cell biology* *93*, 103-110.
- Furuhashi, K., Inagaki, M., Hatano, S., Fukami, K., and Takenawa, T. (1992). Inositol phospholipid-induced suppression of F-actin-gelating activity of smooth muscle filamin. *Biochemical and biophysical research communications* *184*, 1261-1265.
- Gallegos, L.L., Kunkel, M.T., and Newton, A.C. (2006). Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. *The Journal of biological chemistry* *281*, 30947-30956.
- Gary, J.D., Sato, T.K., Stefan, C.J., Bonangelino, C.J., Weisman, L.S., and Emr, S.D. (2002). Regulation of Fab1 phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase pathway by Vac7 protein and Fig4, a polyphosphoinositide phosphatase family member. *Molecular biology of the cell* *13*, 1238-1251.
- Gary, J.D., Wurmser, A.E., Bonangelino, C.J., Weisman, L.S., and Emr, S.D. (1998). Fab1p is essential for PtdIns(3)P 5-kinase activity and the maintenance of vacuolar size and membrane homeostasis. *The Journal of cell biology* *143*, 65-79.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A., and Schiestl, R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic acids research* *20*, 1425.
- Gillooly, D.J., Morrow, I.C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N.J., Gaullier, J.M., Parton, R.G., and Stenmark, H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *The EMBO journal* *19*, 4577-4588.
- Gilmore, A.P., and Burridge, K. (1996). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature* *381*, 531-535.
- Girard, M., Poupon, V., Blondeau, F., and McPherson, P.S. (2005). The DnaJ-domain protein RME-8 functions in endosomal trafficking. *The Journal of biological chemistry* *280*, 40135-40143.
- Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D.R., Kular, G.S., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J.M., and De Matteis, M.A. (2004). FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nature cell biology* *6*, 393-404.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science (New York, NY)* *274*, 546, 563-547.
- Gozani, O., Karuman, P., Jones, D.R., Ivanov, D., Cha, J., Lugovskoy, A.A., Baird, C.L., Zhu, H., Field, S.J., Lessnick, S.L., *et al.* (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* *114*, 99-111.
- Grainger, D.L., Tavelis, C., Ryan, A.J., and Hinchliffe, K.A. (2012). The emerging role of PtdIns5P: another signalling phosphoinositide takes its place. *Biochemical Society transactions* *40*, 257-261.
- Greig, D., and Leu, J.Y. (2009). Natural history of budding yeast. *Curr Biol* *19*, R886-890.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature reviews* *5*, 317-323.
- Guittard, G., Gerard, A., Dupuis-Coronas, S., Tronchere, H., Mortier, E., Favre, C., Olive, D., Zimmermann, P., Payrastra, B., and Nunes, J.A. (2009). Cutting edge: Dok-1 and Dok-2 adaptor molecules are regulated by phosphatidylinositol 5-phosphate production in T cells. *J Immunol* *182*, 3974-3978.
- Guittard, G., Mortier, E., Tronchere, H., Firaguay, G., Gerard, A., Zimmermann, P., Payrastra, B., and Nunes, J.A. (2010). Evidence for a positive role of PtdIns5P in T-cell signal transduction pathways. *FEBS letters* *584*, 2455-2460.

- Guo, S., Stolz, L.E., Lemrow, S.M., and York, J.D. (1999). SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *The Journal of biological chemistry* 274, 12990-12995.
- Hama, H., Takemoto, J.Y., and DeWald, D.B. (2000). Analysis of phosphoinositides in protein trafficking. *Methods (San Diego, Calif)* 20, 465-473.
- Harris, B.Z., and Lim, W.A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *Journal of cell science* 114, 3219-3231.
- Hedberg, C., Lindberg, C., Mathe, G., Moslemi, A.R., and Oldfors, A. (2011). Myopathy in a woman and her daughter associated with a novel splice site MTM1 mutation. *Neuromuscul Disord* 22, 244-251.
- Heinicke, S., Livstone, M.S., Lu, C., Oughtred, R., Kang, F., Angiuoli, S.V., White, O., Botstein, D., and Dolinski, K. (2007). The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): a comparative genomics analysis tool for biologists. *PloS one* 2, e766.
- Hendricks, K.B., Wang, B.Q., Schnieders, E.A., and Thorner, J. (1999). Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase. *Nature cell biology* 1, 234-241.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., and Emr, S.D. (2011). The ESCRT pathway. *Developmental cell* 21, 77-91.
- Herman, G.E., Kopacz, K., Zhao, W., Mills, P.L., Metzzenberg, A., and Das, S. (2002). Characterization of mutations in fifty North American patients with X-linked myotubular myopathy. *Human mutation* 19, 114-121.
- Herman, P.K., and Emr, S.D. (1990). Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 10, 6742-6754.
- Hers, I., Vincent, E.E., and Tavaré, J.M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling* 23, 1515-1527.
- Hilpela, P., Vartiainen, M.K., and Lappalainen, P. (2004). Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3. *Current topics in microbiology and immunology* 282, 117-163.
- Hnia, K., and Laporte, J. (2011). Myotubularine et desmine : Un complexe au service de la dynamique mitochondriale dans le muscle squelettique. *Med Sci (Paris)* 27, 458-460.
- Hnia, K., Tronchère, H., Tomczak, K.K., Amoasii, L., Schultz, P., Beggs, A.H., Payrastre, B., Mandel, J.L., and Laporte, J. (2011). Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation* 121, 70-85.
- Ho, C.Y., Alghamdi, T.A., and Botelho, R.J. (2011). Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate: no longer the poor PIP2. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 13, 1-8.
- Hokin, M.R., and Hokin, L.E. (1953). Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices. *The Journal of biological chemistry* 203, 967-977.
- Horazdovsky, B.F., DeWald, D.B., and Emr, S.D. (1995). Protein transport to the yeast vacuole. *Current opinion in cell biology* 7, 544-551.
- Houlden, H., King, R.H., Wood, N.W., Thomas, P.K., and Reilly, M.M. (2001). Mutations in the 5' region of the myotubularin-related protein 2 (MTMR2) gene in autosomal recessive hereditary neuropathy with focally folded myelin. *Brain* 124, 907-915.
- Hughes, W.E., Cooke, F.T., and Parker, P.J. (2000). Sac phosphatase domain proteins. *The Biochemical journal* 350 Pt 2, 337-352.
- Hunter, T. (1998). Anti-phosphatases take the stage. *Nature genetics* 18, 303-305.
- Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., Delvecchio, K., Xie, Y., Jin, J.P., Rappolee, D., and Shisheva, A. (2011). The phosphoinositide kinase PIKfyve is vital in early embryonic development: preimplantation lethality of PIKfyve<sup>-/-</sup> embryos but normality of PIKfyve<sup>+/-</sup> mice. *The Journal of biological chemistry* 286, 13404-13413.
- Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., Fligger, J., Delvecchio, K., and Shisheva, A. (2010). ArPIKfyve regulates Sac3 protein abundance and turnover: disruption of the mechanism by Sac3I41T mutation causing Charcot-Marie-Tooth 4J disorder. *The Journal of biological chemistry* 285, 26760-26764.
- Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., Ijuin, T., Takenawa, T., and Shisheva, A. (2009). Sac3 is an insulin-regulated phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate phosphatase: gain in insulin responsiveness

- through Sac3 down-regulation in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 284, 23961-23971.
- Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., and Shisheva, A. (2001). Mammalian cell morphology and endocytic membrane homeostasis require enzymatically active phosphoinositide 5-kinase PIKfyve. *The Journal of biological chemistry* 276, 26141-26147.
- Isakoff, S.J., Cardozo, T., Andreev, J., Li, Z., Ferguson, K.M., Abagyan, R., Lemmon, M.A., Aronheim, A., and Skolnik, E.Y. (1998). Identification and analysis of PH domain-containing targets of phosphatidylinositol 3-kinase using a novel in vivo assay in yeast. *The EMBO journal* 17, 5374-5387.
- Ishihara, H., Shibasaki, Y., Kizuki, N., Katagiri, H., Yazaki, Y., Asano, T., and Oka, Y. (1996). Cloning of cDNAs encoding two isoforms of 68-kDa type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *The Journal of biological chemistry* 271, 23611-23614.
- Ishihara, H., Shibasaki, Y., Kizuki, N., Wada, T., Yazaki, Y., Asano, T., and Oka, Y. (1998). Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *The Journal of biological chemistry* 273, 8741-8748.
- Itoh, T., and Takenawa, T. (2002). Phosphoinositide-binding domains: Functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signalling. *Cellular signalling* 14, 733-743.
- Jin, N., Chow, C.Y., Liu, L., Zolov, S.N., Bronson, R., Davisson, M., Petersen, J.L., Zhang, Y., Park, S., Duex, J.E., *et al.* (2008). VAC14 nucleates a protein complex essential for the acute interconversion of PI3P and PI(3,5)P(2) in yeast and mouse. *The EMBO journal* 27, 3221-3234.
- Johnson, L.M., Bankaitis, V.A., and Emr, S.D. (1987). Distinct sequence determinants direct intracellular sorting and modification of a yeast vacuolar protease. *Cell* 48, 875-885.
- Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C., and Laporte, J. (2008). Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet journal of rare diseases* 3, 26.
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., and Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PloS one* 6, e16015.
- Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *The Journal of cell biology* 162, 413-423.
- Kavran, J.M., Klein, D.E., Lee, A., Falasca, M., Isakoff, S.J., Skolnik, E.Y., and Lemmon, M.A. (1998). Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *The Journal of biological chemistry* 273, 30497-30508.
- Kerk, D., and Moorhead, G.B. (2010). A phylogenetic survey of myotubularin genes of eukaryotes: distribution, protein structure, evolution, and gene expression. *BMC evolutionary biology* 10, 196.
- Khurana, V., and Lindquist, S. (2010). Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? *Nat Rev Neurosci* 11, 436-449.
- Kim, S.A., Taylor, G.S., Torgersen, K.M., and Dixon, J.E. (2002). Myotubularin and MTMR2, phosphatidylinositol 3-phosphatases mutated in myotubular myopathy and type 4B Charcot-Marie-Tooth disease. *The Journal of biological chemistry* 277, 4526-4531.
- Kim, S.A., Vacratsis, P.O., Firestein, R., Cleary, M.L., and Dixon, J.E. (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.
- Kim, Y.J., Guzman-Hernandez, M.L., and Balla, T. (2011). A highly dynamic ER-derived phosphatidylinositol-synthesizing organelle supplies phosphoinositides to cellular membranes. *Developmental cell* 21, 813-824.
- Kimber, W.A., Deak, M., Prescott, A.R., and Alessi, D.R. (2003). Interaction of the protein tyrosine phosphatase PTPL1 with the PtdIns(3,4)P2-binding adaptor protein TAPP1. *The Biochemical journal* 376, 525-535.
- Kirschner, M.W. (2005). The meaning of systems biology. *Cell* 121, 503-504.
- Klarlund, J.K., Rameh, L.E., Cantley, L.C., Buxton, J.M., Holik, J.J., Sakelis, C., Patki, V., Corvera, S., and Czech, M.P. (1998). Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* 273, 1859-1862.

- Klein, D.E., Lee, A., Frank, D.W., Marks, M.S., and Lemmon, M.A. (1998). The pleckstrin homology domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding. *The Journal of biological chemistry* 273, 27725-27733.
- Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., and Seeburg, P.H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science (New York, NY)* 269, 1737-1740.
- Laporte, J., Bedez, F., Bolino, A., and Mandel, J.L. (2003). Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases. *Human molecular genetics 12 Spec No 2*, R285-292.
- Laporte, J., Blondeau, F., Buj-Bello, A., Tentler, D., Kretz, C., Dahl, N., and Mandel, J.L. (1998). Characterization of the myotubularin dual specificity phosphatase gene family from yeast to human. *Human molecular genetics* 7, 1703-1712.
- Laporte, J., Blondeau, F., Gansmuller, A., Lutz, Y., Vonesch, J.L., and Mandel, J.L. (2002). The PtdIns3P phosphatase myotubularin is a cytoplasmic protein that also localizes to Rac1-inducible plasma membrane ruffles. *Journal of cell science* 115, 3105-3117.
- Laporte, J., Guiraud-Chaumeil, C., Vincent, M.C., Mandel, J.L., Tanner, S.M., Liechti-Gallati, S., Wallgren-Pettersson, C., Dahl, N., Kress, W., Bolhuis, P.A., *et al.* (1997). Mutations in the MTM1 gene implicated in X-linked myotubular myopathy. ENMC International Consortium on Myotubular Myopathy. European Neuro-Muscular Center. *Human molecular genetics* 6, 1505-1511.
- Laporte, J., Hu, L.J., Kretz, C., Mandel, J.L., Kioschis, P., Coy, J.F., Klauck, S.M., Poustka, A., and Dahl, N. (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, J., Kress, W., and Mandel, J.L. (2001). Diagnosis of X-linked myotubular myopathy by detection of myotubularin. *Annals of neurology* 50, 42-46.
- Lecompte, O., Poch, O., and Laporte, J. (2008). PtdIns5P regulation through evolution: roles in membrane trafficking? *Trends in biochemical sciences* 33, 453-460.
- Lemmon, M.A., and Ferguson, K.M. (2001). Molecular determinants in pleckstrin homology domains that allow specific recognition of phosphoinositides. *Biochemical Society transactions* 29, 377-384.
- Leslie, N.R., and Downes, C.P. (2002). PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cellular signalling* 14, 285-295.
- Levine, T.P., and Munro, S. (2001). Dual targeting of Osh1p, a yeast homologue of oxysterol-binding protein, to both the Golgi and the nucleus-vacuole junction. *Molecular biology of the cell* 12, 1633-1644.
- Levine, T.P., and Munro, S. (2002). Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components. *Curr Biol* 12, 695-704.
- Liao, Y., and Hung, M.C. (2011). Physiological regulation of Akt activity and stability. *American journal of translational research* 2, 19-42.
- Lindmo, K., and Stenmark, H. (2006). Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *Journal of cell science* 119, 605-614.
- Liu, Y., and Bankaitis, V.A. (2010). Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease. *Progress in lipid research* 49, 201-217.
- Liu, Y., Boukhelifa, M., Tribble, E., and Bankaitis, V.A. (2009). Functional studies of the mammalian Sac1 phosphoinositide phosphatase. *Advances in enzyme regulation* 49, 75-86.
- Lorente-Rodriguez, A., and Barlowe, C. (2011). Requirement for Golgi-localized PI(4)P in fusion of COPII vesicles with Golgi compartments. *Molecular biology of the cell* 22, 216-229.
- Lorenzo, O., Urbe, S., and Clague, M.J. (2005). Analysis of phosphoinositide binding domain properties within the myotubularin-related protein MTMR3. *Journal of cell science* 118, 2005-2012.
- Lorenzo, O., Urbe, S., and Clague, M.J. (2006). Systematic analysis of myotubularins: heteromeric interactions, subcellular localisation and endosome related functions. *Journal of cell science* 119, 2953-2959.



- Luo, Z., and Gallwitz, D. (2003). Biochemical and genetic evidence for the involvement of yeast Ypt6-GTPase in protein retrieval to different Golgi compartments. *The Journal of biological chemistry* 278, 791-799.
- Lykidis, A., Jackson, P.D., Rock, C.O., and Jackowski, S. (1997). The role of CDP-diacylglycerol synthetase and phosphatidylinositol synthase activity levels in the regulation of cellular phosphatidylinositol content. *The Journal of biological chemistry* 272, 33402-33409.
- Maehama, T., and Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* 273, 13375-13378.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Marat, A.L., Dokainish, H., and McPherson, P.S. (2011). DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases. *The Journal of biological chemistry* 286, 13791-13800.
- Marcus, A.J., Ullman, H.L., and Safier, L.B. (1969). Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *Journal of lipid research* 10, 108-114.
- Mason, D., Mallo, G.V., Terebiznik, M.R., Payrastra, B., Finlay, B.B., Brumell, J.H., Rameh, L., and Grinstein, S. (2007). Alteration of epithelial structure and function associated with PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> degradation by a bacterial phosphatase. *The Journal of general physiology* 129, 267-283.
- Mason, J.M., and Arndt, K.M. (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem* 5, 170-176.
- Mauco, G., Dangelmaier, C.A., and Smith, J.B. (1984). Inositol lipids, phosphatidate and diacylglycerol share stearyl arachidonoylglycerol as a common backbone in thrombin-stimulated human platelets. *The Biochemical journal* 224, 933-940.
- Mayinger, P. (2009). Regulation of Golgi function via phosphoinositide lipids. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 793-800.
- Mei, J., Li, Z., and Gui, J.F. (2009). Cooperation of Mtmr8 with PI3K regulates actin filament modeling and muscle development in zebrafish. *PloS one* 4, e4979.
- Mei, J., Liu, S., Li, Z., and Gui, J.F. (2010). Mtmr8 is essential for vasculature development in zebrafish embryos. *BMC developmental biology* 10, 96.
- Michell, R.H. (2008). Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature reviews* 9, 151-161.
- Michell, R.H. (2011). Inositol and its derivatives: their evolution and functions. *Advances in enzyme regulation* 51, 84-90.
- Michell, R.H., Heath, V.L., Lemmon, M.A., and Dove, S.K. (2006). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: metabolism and cellular functions. *Trends in biochemical sciences* 31, 52-63.
- Milne, S.B., Ivanova, P.T., DeCamp, D., Hsueh, R.C., and Brown, H.A. (2005). A targeted mass spectrometric analysis of phosphatidylinositol phosphate species. *Journal of lipid research* 46, 1796-1802.
- Milner, D.J., Mavroidis, M., Weisleder, N., and Capetanaki, Y. (2000). Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *The Journal of cell biology* 150, 1283-1298.
- Mitra, P., Zhang, Y., Rameh, L.E., Ivshina, M.P., McCollum, D., Nunnari, J.J., Hendricks, G.M., Kerr, M.L., Field, S.J., Cantley, L.C., *et al.* (2004). A novel phosphatidylinositol(3,4,5)P<sub>3</sub> pathway in fission yeast. *The Journal of cell biology* 166, 205-211.
- Mochizuki, Y., and Majerus, P.W. (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.
- Morris, J.B., Hinchliffe, K.A., Ciruela, A., Letcher, A.J., and Irvine, R.F. (2000). Thrombin stimulation of platelets causes an increase in phosphatidylinositol 5-phosphate revealed by mass assay. *FEBS letters* 475, 57-60.
- Mortier, E., Wuytens, G., Leenaerts, I., Hannes, F., Heung, M.Y., Degeest, G., David, G., and Zimmermann, P. (2005). Nuclear speckles and nucleoli targeting by PIP<sub>2</sub>-PDZ domain interactions. *The EMBO journal* 24, 2556-2565.
- Mustacchi, R., Hohmann, S., and Nielsen, J. (2006). Yeast systems biology to unravel the network of life. *Yeast (Chichester, England)* 23, 227-238.

- Nandurkar, H.H., Caldwell, K.K., Whisstock, J.C., Layton, M.J., Gaudet, E.A., Norris, F.A., Majerus, P.W., and Mitchell, C.A. (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 of the United States of America* *98*, 9499-9504.
- Nandurkar, H.H., Layton, M., Laporte, J., Selan, C., Corcoran, L., Caldwell, K.K., Mochizuki, Y., Majerus, P.W., and Mitchell, C.A. (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.
- Naughtin, M.J., Sheffield, D.A., Rahman, P., Hughes, W.E., Gurung, R., Stow, J.L., Nandurkar, H.H., Dyson, J.M., and Mitchell, C.A. (2010). The myotubularin phosphatase MTMR4 regulates sorting from early endosomes. *Journal of cell science* *123*, 3071-3083.
- Neukomm, L.J., Nicot, A.S., Kinchen, J.M., Almendinger, J., Pinto, S.M., Zeng, S., Doukoumetzidis, K., Tronchere, H., Payrastra, B., Laporte, J.F., *et al.* (2011). The phosphoinositide phosphatase MTM-1 regulates apoptotic cell corpse clearance through CED-5-CED-12 in *C. elegans*. *Development (Cambridge, England)* *138*, 2003-2014.
- Nice, D.C., Sato, T.K., Stromhaug, P.E., Emr, S.D., and Klionsky, D.J. (2002). Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *The Journal of biological chemistry* *277*, 30198-30207.
- Nicot, A.S., Fares, H., Payrastra, B., Chisholm, A.D., Labouesse, M., and Laporte, J. (2006). The phosphoinositide kinase PIKfyve/Fab1p regulates terminal lysosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell* *17*, 3062-3074.
- Nicot, A.S., and Laporte, J. (2008). Endosomal phosphoinositides and human diseases. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* *9*, 1240-1249.
- Niebuhr, K., Giuriato, S., Pedron, T., Philpott, D.J., Gaits, F., Sable, J., Sheetz, M.P., Parsot, C., Sansonetti, P.J., and Payrastra, B. (2002). Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the *S.flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. *The EMBO journal* *21*, 5069-5078.
- Niethammer, M., Kim, E., and Sheng, M. (1996). Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* *16*, 2157-2163.
- Nikawa, J., and Yamashita, S. (1984). Molecular cloning of the gene encoding CDPdiacylglycerol-inositol 3-phosphatidyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *European journal of biochemistry / FEBS* *143*, 251-256.
- Noda, T., Matsunaga, K., Taguchi-Atarashi, N., and Yoshimori, T. (2010). Regulation of membrane biogenesis in autophagy via PI3P dynamics. *Seminars in cell & developmental biology* *21*, 671-676.
- Norris, F.A., Atkins, R.C., and Majerus, P.W. (1997). The cDNA cloning and characterization of inositol polyphosphate 4-phosphatase type II. Evidence for conserved alternative splicing in the 4-phosphatase family. *The Journal of biological chemistry* *272*, 23859-23864.
- Norris, F.A., Auethavekiat, V., and Majerus, P.W. (1995). The isolation and characterization of cDNA encoding human and rat brain inositol polyphosphate 4-phosphatase. *The Journal of biological chemistry* *270*, 16128-16133.
- Norris, F.A., and Majerus, P.W. (1994). Hydrolysis of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate by inositol polyphosphate 4-phosphatase isolated by affinity elution chromatography. *The Journal of biological chemistry* *269*, 8716-8720.
- Nourry, C., Grant, S.G., and Borg, J.P. (2003). PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE* *2003*, RE7.
- Obara, K., Noda, T., Niimi, K., and Ohsumi, Y. (2008). Transport of phosphatidylinositol 3-phosphate into the vacuole via autophagic membranes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* *13*, 537-547.
- Odorizzi, G., Babst, M., and Emr, S.D. (1998). Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* *95*, 847-858.
- Odorizzi, G., Babst, M., and Emr, S.D. (2000). Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends in biochemical sciences* *25*, 229-235.

- Pagliarini, D.J., Worby, C.A., and Dixon, J.E. (2004). A PTEN-like phosphatase with a novel substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* 279, 38590-38596.
- Panaretou, C., Domin, J., Cockcroft, S., and Waterfield, M.D. (1997). Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex. *The Journal of biological chemistry* 272, 2477-2485.
- Parker, P.J. (2004). The ubiquitous phosphoinositides. *Biochemical Society transactions* 32, 893-898.
- Parrish, W.R., Stefan, C.J., and Emr, S.D. (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.
- Partridge, T.A. (2011). Impending therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Current opinion in neurology* 24, 415-422.
- Payraastre, B. (2004). Phosphoinositides: lipid kinases and phosphatases. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 273, 201-212.
- Payraastre, B., Missy, K., Giuriato, S., Bodin, S., Plantavid, M., and Gratacap, M. (2001). Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space. *Cellular signalling* 13, 377-387.
- Pena-Castillo, L., and Hughes, T.R. (2007). Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? *Genetics* 176, 7-14.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E.F., Meijer, A.J., and Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 992-998.
- Pettitt, T.R., Dove, S.K., Lubben, A., Calaminus, S.D., and Wakelam, M.J. (2006). Analysis of intact phosphoinositides in biological samples. *Journal of lipid research* 47, 1588-1596.
- Pierson, C.R., Dulin-Smith, A.N., Durban, A.N., Marshall, M.L., Marshall, J.T., Snyder, A.D., Naiyer, N., Gladman, J.T., Chandler, D.S., Lawlor, M.W., *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.
- Piper, R.C., Cooper, A.A., Yang, H., and Stevens, T.H. (1995). VPS27 controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 131, 603-617.
- Previtali, S.C., Zerega, B., Sherman, D.L., Brophy, P.J., Dina, G., King, R.H., Salih, M.M., Feltri, L., Quattrini, A., Ravazzolo, R., *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.
- Quattrone, A., Gambardella, A., Bono, F., Aguglia, U., Bolino, A., Bruni, A.C., Montesi, M.P., Oliveri, R.L., Sabatelli, M., Tamburrini, O., *et al.* (1996). Autosomal recessive hereditary motor and sensory neuropathy with focally folded myelin sheaths: clinical, electrophysiologic, and genetic aspects of a large family. *Neurology* 46, 1318-1324.
- Rameh, L.E., and Cantley, L.C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *The Journal of biological chemistry* 274, 8347-8350.
- Rameh, L.E., Tolias, K.F., Duckworth, B.C., and Cantley, L.C. (1997). A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 390, 192-196.
- Ranganathan, R., and Ross, E.M. (1997). PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr Biol* 7, R770-773.
- Razidlo, G.L., Katafiasz, D., and Taylor, G.S. (2011). Myotubularin regulates Akt-dependent survival signaling via phosphatidylinositol 3-phosphate. *The Journal of biological chemistry* 286, 20005-20019.
- Reggiori, F., Tucker, K.A., Stromhaug, P.E., and Klionsky, D.J. (2004). The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Developmental cell* 6, 79-90.
- Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M.S., *et al.* (2011). Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell host & microbe* 9, 32-45.

- Robinson, F.L., and Dixon, J.E. (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.
- Robinson, F.L., and Dixon, J.E. (2006). Myotubularin phosphatases: policing 3-phosphoinositides. *Trends in cell biology* 16, 403-412.
- Robinson, F.L., Niesman, I.R., Beiswenger, K.K., and Dixon, J.E. (2008). Loss of the inactive myotubularin-related phosphatase Mtmr13 leads to a Charcot-Marie-Tooth 4B2-like peripheral neuropathy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4916-4921.
- Roth, M.G. (2004). Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiological reviews* 84, 699-730.
- Rothman, J.H., Howald, I., and Stevens, T.H. (1989). Characterization of genes required for protein sorting and vacuolar function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 8, 2057-2065.
- Rothman, J.H., and Stevens, T.H. (1986). Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway. *Cell* 47, 1041-1051.
- Rudge, S.A., Anderson, D.M., and Emr, S.D. (2004a). Vacuole size control: regulation of PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> levels by the vacuole-associated Vac14-Fig4 complex, a PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>-specific phosphatase. *Molecular biology of the cell* 15, 24-36.
- Rudge, S.A., Sciorra, V.A., Iwamoto, M., Zhou, C., Strahl, T., Morris, A.J., Thorner, J., and Engebrecht, J. (2004b). Roles of phosphoinositides and of Spo14p (phospholipase D)-generated phosphatidic acid during yeast sporulation. *Molecular biology of the cell* 15, 207-218.
- Rusten, T.E., Rodahl, L.M., Pattni, K., Englund, C., Samakovlis, C., Dove, S., Brech, A., and Stenmark, H. (2006). Fab1 phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase controls trafficking but not silencing of endocytosed receptors. *Molecular biology of the cell* 17, 3989-4001.
- Rutherford, A.C., Traer, C., Wassmer, T., Pattni, K., Bujny, M.V., Carlton, J.G., Stenmark, H., and Cullen, P.J. (2006). The mammalian phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) regulates endosome-to-TGN retrograde transport. *Journal of cell science* 119, 3944-3957.
- Saporta, A.S., Sottile, S.L., Miller, L.J., Feely, S.M., Siskind, C.E., and Shy, M.E. (2011). Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol* 69, 22-33.
- Sarkes, D., and Rameh, L.E. (2010). A novel HPLC-based approach makes possible the spatial characterization of cellular PtdIns5P and other phosphoinositides. *The Biochemical journal* 428, 375-384.
- Sarnat, H.B. (1990). Myotubular myopathy: arrest of morphogenesis of myofibres associated with persistence of fetal vimentin and desmin. Four cases compared with fetal and neonatal muscle. *Can J Neurol Sci* 17, 109-123.
- Sarnat, H.B., Roth, S.I., and Jimenez, J.F. (1981). Neonatal myotubular myopathy: neuropathy and failure of postnatal maturation of fetal muscle. *Can J Neurol Sci* 8, 313-320.
- Sasaki, T., Takasuga, S., Sasaki, J., Kofuji, S., Eguchi, S., Yamazaki, M., and Suzuki, A. (2009). Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Progress in lipid research* 48, 307-343.
- Sawchak, J.A., Sher, J.H., Norman, M.G., Kula, R.W., and Shafiq, S.A. (1991). Centronuclear myopathy heterogeneity: distinction of clinical types by myosin isoform patterns. *Neurology* 41, 135-140.
- Sbrissa, D., Ikonomov, O.C., Deeb, R., and Shisheva, A. (2002). Phosphatidylinositol 5-phosphate biosynthesis is linked to PIKfyve and is involved in osmotic response pathway in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 47276-47284.
- Sbrissa, D., Ikonomov, O.C., Fu, Z., Ijuin, T., Gruenberg, J., Takenawa, T., and Shisheva, A. (2007). Core protein machinery for mammalian phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate synthesis and turnover that regulates the progression of endosomal transport. Novel Sac phosphatase joins the ArPIKfyve-PIKfyve complex. *The Journal of biological chemistry* 282, 23878-23891.
- Sbrissa, D., Ikonomov, O.C., Strakova, J., and Shisheva, A. (2004). Role for a novel signaling intermediate, phosphatidylinositol 5-phosphate, in insulin-regulated F-actin stress fiber breakdown and GLUT4 translocation. *Endocrinology* 145, 4853-4865.

- Schaletzky, J., Dove, S.K., Short, B., Lorenzo, O., Clague, M.J., and Barr, F.A. (2003). Phosphatidylinositol-5-phosphate activation and conserved substrate specificity of the myotubularin phosphatidylinositol 3-phosphatases. *Curr Biol* 13, 504-509.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., and Liu, J.O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature chemical biology* 6, 209-217.
- Schu, P.V., Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D., and Emr, S.D. (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* (New York, NY 260, 88-91.
- Senderek, J., Bergmann, C., Weber, S., Ketelsen, U.P., Schorle, H., Rudnik-Schoneborn, S., Buttner, R., Buchheim, E., and Zerres, K. (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.
- Shaw, J.D., Hama, H., Sohrabi, F., DeWald, D.B., and Wendland, B. (2003). PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> is required for delivery of endocytic cargo into the multivesicular body. *Traffic* (Copenhagen, Denmark) 4, 479-490.
- Shears, S.B. (2004). How versatile are inositol phosphate kinases? *The Biochemical journal* 377, 265-280.
- Sher, J.H., Rimalovski, A.B., Athanassiades, T.J., and Aronson, S.M. (1967). Familial centronuclear myopathy: a clinical and pathological study. *Neurology* 17, 727-742.
- Shisheva, A. (2008). PIKfyve: Partners, significance, debates and paradoxes. *Cell biology international* 32, 591-604.
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M., and Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394, 494-498.
- Singer-Kruger, B., Nemoto, Y., Daniell, L., Ferro-Novick, S., and De Camilli, P. (1998). Synaptojanin family members are implicated in endocytic membrane traffic in yeast. *Journal of cell science* 111 (Pt 22), 3347-3356.
- Singer, W.D., Brown, H.A., and Sternweis, P.C. (1997). Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annual review of biochemistry* 66, 475-509.
- Slessareva, J.E., Routt, S.M., Temple, B., Bankaitis, V.A., and Dohlman, H.G. (2006). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome. *Cell* 126, 191-203.
- Smith, M.G., and Snyder, M. (2006). Yeast as a model for human disease. *Curr Protoc Hum Genet Chapter 15*, Unit 15 16.
- Soussi-Yanicostas, N., Chevally, M., Laurent-Winter, C., Tome, F.M., Fardeau, M., and Butler-Browne, G.S. (1991). Distinct contractile protein profile in congenital myotonic dystrophy and X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscul Disord* 1, 103-111.
- Spector, A.A., and Yorek, M.A. (1985). Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of lipid research* 26, 1015-1035.
- Spiro, A.J., Shy, G.M., and Gonatas, N.K. (1966). Myotubular myopathy. Persistence of fetal muscle in an adolescent boy. *Archives of neurology* 14, 1-14.
- Srivastava, S., Choudhury, P., Li, Z., Liu, G., Nadkarni, V., Ko, K., Coetzee, W.A., and Skolnik, E.Y. (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, S., Li, Z., Lin, L., Liu, G., Ko, K., Coetzee, W.A., and Skolnik, E.Y. (2005). The phosphatidylinositol 3-phosphate phosphatase myotubularin-related protein 6 (MTMR6) is a negative regulator of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel KCa3.1. *Molecular and cellular biology* 25, 3630-3638.
- Stahelin, R.V., Long, F., Diraviyam, K., Bruzik, K.S., Murray, D., and Cho, W. (2002). Phosphatidylinositol 3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vps27p and Hrs. *The Journal of biological chemistry* 277, 26379-26388.

- Stassen, M.J., Bailey, D., Nelson, S., Chinwalla, V., and Harte, P.J. (1995). The *Drosophila trithorax* proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mechanisms of development* 52, 209-223.
- Stevens, T., Esmon, B., and Schekman, R. (1982). Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. *Cell* 30, 439-448.
- Strahl, T., Hama, H., DeWald, D.B., and Thorner, J. (2005). Yeast phosphatidylinositol 4-kinase, Pik1, has essential roles at the Golgi and in the nucleus. *The Journal of cell biology* 171, 967-979.
- Strahl, T., and Thorner, J. (2007). Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1771, 353-404.
- Strand, M., Prolla, T.A., Liskay, R.M., and Petes, T.D. (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365, 274-276.
- Sun, Y., Carroll, S., Kaksonen, M., Toshima, J.Y., and Drubin, D.G. (2007). PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> turnover is required for multiple stages during clathrin- and actin-dependent endocytic internalization. *The Journal of cell biology* 177, 355-367.
- Taguchi-Atarashi, N., Hamasaki, M., Matsunaga, K., Omori, H., Ktistakis, N.T., Yoshimori, T., and Noda, T. (2010). Modulation of local PtdIns3P levels by the PI phosphatase MTMR3 regulates constitutive autophagy. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11, 468-478.
- Takegawa, K., Iwaki, T., Fujita, Y., Morita, T., Hosomi, A., and Tanaka, N. (2003). Vesicle-mediated protein transport pathways to the vacuole in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell structure and function* 28, 399-417.
- Taylor, G.S., and Dixon, J.E. (2001). An assay for phosphoinositide phosphatases utilizing fluorescent substrates. *Analytical biochemistry* 295, 122-126.
- Taylor, G.S., Maehama, T., and Dixon, J.E. (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.
- Tersar, K., Boentert, M., Berger, P., Bonneick, S., Wessig, C., Toyka, K.V., Young, P., and Suter, U. (2007). Mtmr13/Sbf2-deficient mice: an animal model for CMT4B2. *Human molecular genetics* 16, 2991-3001.
- Terui, T., Kahn, R.A., and Randazzo, P.A. (1994). Effects of acid phospholipids on nucleotide exchange properties of ADP-ribosylation factor 1. Evidence for specific interaction with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of biological chemistry* 269, 28130-28135.
- Thomas, N.S., Williams, H., Cole, G., Roberts, K., Clarke, A., Liechti-Gallati, S., Braga, S., Gerber, A., Meier, C., Moser, H., *et al.* (1990). X linked neonatal centronuclear/myotubular myopathy: evidence for linkage to Xq28 DNA marker loci. *Journal of medical genetics* 27, 284-287.
- Toker, A. (1998). The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Current opinion in cell biology* 10, 254-261.
- Tooth, H. (1886). *The peroneal type of progressive muscular atrophy*. London: Lewis.
- Tosch, V., Rohde, H.M., Tronchere, H., Zanoteli, E., Monroy, N., Kretz, C., Dondaine, N., Payrastre, B., Mandel, J.L., and Laporte, J. (2006). A novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy. *Human molecular genetics* 15, 3098-3106.
- Tosch, V., Vasli, N., Kretz, C., Nicot, A.S., Gasnier, C., Dondaine, N., Oriot, D., Barth, M., Puissant, H., Romero, N.B., *et al.* (2010). Novel molecular diagnostic approaches for X-linked centronuclear (myotubular) myopathy reveal intronic mutations. *Neuromuscul Disord* 20, 375-381.
- Treusch, S., Hamamichi, S., Goodman, J.L., Matlack, K.E., Chung, C.Y., Baru, V., Shulman, J.M., Parrado, A., Bevis, B.J., Valastyan, J.S., *et al.* (2011). Functional links between Abeta toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science (New York, NY)* 334, 1241-1245.
- Trevelyan, W.E. (1966). Preparation of phosphatidyl inositol from baker's yeast. *Journal of lipid research* 7, 445-447.
- Tribouillard-Tanvier, D., Beringue, V., Desban, N., Gug, F., Bach, S., Voisset, C., Galons, H., Laude, H., Vilette, D., and Blondel, M. (2008). Antihypertensive drug guanabenz is active in vivo against both yeast and mammalian prions. *PloS one* 3, e1981.

- Tronchere, H., Laporte, J., Pendaries, C., Chaussade, C., Liaubet, L., Pirola, L., Mandel, J.L., and Payrastre, B. (2004). Production of phosphatidylinositol 5-phosphate by the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 7304-7312.
- Tsai, T.C., Horinouchi, H., Noguchi, S., Minami, N., Murayama, K., Hayashi, Y.K., Nonaka, I., and Nishino, I. (2005). Characterization of MTM1 mutations in 31 Japanese families with myotubular myopathy, including a patient carrying 240 kb deletion in Xq28 without male hypogenitalism. *Neuromuscul Disord* 15, 245-252.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., and Reuter, G. (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *The EMBO journal* 13, 3822-3831.
- Tsujita, K., Itoh, T., Ijuin, T., Yamamoto, A., Shisheva, A., Laporte, J., and Takenawa, T. (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.
- Vaccari, I., Dina, G., Tronchere, H., Kaufman, E., Chicanne, G., Cerri, F., Wrabetz, L., Payrastre, B., Quattrini, A., Weisman, L.S., *et al.* (2011). Genetic interaction between MTMR2 and FIG4 phospholipid phosphatases involved in Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *PLoS genetics* 7, e1002319.
- Valls, L.A., Hunter, C.P., Rothman, J.H., and Stevens, T.H. (1987). Protein sorting in yeast: the localization determinant of yeast vacuolar carboxypeptidase Y resides in the propeptide. *Cell* 48, 887-897.
- Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X., and Vandenhoute, J. (2003). Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast (Chichester, England)* 20, 739-746.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., and Waterfield, M.D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annual review of biochemistry* 70, 535-602.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Panayotou, G., and Waterfield, M.D. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends in biochemical sciences* 22, 267-272.
- Varnai, P., and Balla, T. (2007). Visualization and manipulation of phosphoinositide dynamics in live cells using engineered protein domains. *Pflugers Arch* 455, 69-82.
- Vergne, I., and Deretic, V. (2010). The role of PI3P phosphatases in the regulation of autophagy. *FEBS letters* 584, 1313-1318.
- Vergne, I., Roberts, E., Elmaoued, R.A., Tosch, V., Delgado, M.A., Proikas-Cezanne, T., Laporte, J., and Deretic, V. (2009). Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy. *The EMBO journal* 28, 2244-2258.
- Verhoeven, A.J., Tysnes, O.B., Aarbakke, G.M., Cook, C.A., and Holmsen, H. (1987). Turnover of the phosphomonoester groups of polyphosphoinositol lipids in unstimulated human platelets. *European journal of biochemistry / FEBS* 166, 3-9.
- Vida, T.A., and Emr, S.D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *The Journal of cell biology* 128, 779-792.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 10, 1793-1808.
- Walker, D.M., Urbe, S., Dove, S.K., Tenza, D., Raposo, G., and Clague, M.J. (2001a). Characterization of MTMR3. an inositol lipid 3-phosphatase with novel substrate specificity. *Curr Biol* 11, 1600-1605.
- Walker, S.M., Downes, C.P., and Leslie, N.R. (2001b). TPIP: a novel phosphoinositide 3-phosphatase. *The Biochemical journal* 360, 277-283.
- Wang, C.W., and Klionsky, D.J. (2003). The molecular mechanism of autophagy. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 9, 65-76.
- Wang, P.Y., Weng, J., and Anderson, R.G. (2005). OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation. *Science (New York, NY)* 307, 1472-1476.

- Watt, S.A., Kular, G., Fleming, I.N., Downes, C.P., and Lucocq, J.M. (2002). Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *The Biochemical journal* 363, 657-666.
- Wera, S., Bergsma, J.C., and Thevelein, J.M. (2001). Phosphoinositides in yeast: genetically tractable signalling. *FEMS yeast research* 1, 9-13.
- Whitley, P., Reaves, B.J., Hashimoto, M., Riley, A.M., Potter, B.V., and Holman, G.D. (2003). Identification of mammalian Vps24p as an effector of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-dependent endosome compartmentalization. *The Journal of biological chemistry* 278, 38786-38795.
- Wiedemann, C., and Cockcroft, S. (1998). The Role of Phosphatidylinositol Transfer Proteins (PITPs) in Intracellular Signalling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 9, 324-328.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., *et al.* (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science (New York, NY)* 285, 901-906.
- Wiradajaja, F., Ooms, L.M., Whisstock, J.C., McColl, B., Helfenbaum, L., Sambrook, J.F., Gething, M.J., and Mitchell, C.A. (2001). The yeast inositol polyphosphate 5-phosphatase Inp54p localizes to the endoplasmic reticulum via a C-terminal hydrophobic anchoring tail: regulation of secretion from the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 276, 7643-7653.
- Wood, C.S., Schmitz, K.R., Bessman, N.J., Setty, T.G., Ferguson, K.M., and Burd, C.G. (2009). PtdIns4P recognition by Vps74/GOLPH3 links PtdIns 4-kinase signaling to retrograde Golgi trafficking. *The Journal of cell biology* 187, 967-975.
- Wurmser, A.E., and Emr, S.D. (1998). Phosphoinositide signaling and turnover: PtdIns(3)P, a regulator of membrane traffic, is transported to the vacuole and degraded by a process that requires luminal vacuolar hydrolase activities. *The EMBO journal* 17, 4930-4942.
- Xhabija, B., Taylor, G.S., Fujibayashi, A., Sekiguchi, K., and Vacratsis, P.O. (2012). Receptor mediated endocytosis 8 is a novel PI(3)P binding protein regulated by myotubularin-related 2. *FEBS letters* 585, 1722-1728.
- Xiao, J., Engel, J.L., Zhang, J., Chen, M.J., Manning, G., and Dixon, J.E. (2011). Structural and functional analysis of PTPMT1, a phosphatase required for cardiolipin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 11860-11865.
- Yamamoto, A., DeWald, D.B., Boronenkov, I.V., Anderson, R.A., Emr, S.D., and Koshland, D. (1995). Novel PI(4)P 5-kinase homologue, Fab1p, essential for normal vacuole function and morphology in yeast. *Molecular biology of the cell* 6, 525-539.
- Yan, J., Wen, W., Xu, W., Long, J.F., Adams, M.E., Froehner, S.C., and Zhang, M. (2005). Structure of the split PH domain and distinct lipid-binding properties of the PH-PDZ supramodule of alpha-syntrophin. *The EMBO journal* 24, 3985-3995.
- Yanagiya, T., Tanabe, A., Iida, A., Saito, S., Sekine, A., Takahashi, A., Tsunoda, T., Kamohara, S., Nakata, Y., Kotani, K., *et al.* (2007). Association of single-nucleotide polymorphisms in MTMR9 gene with obesity. *Human molecular genetics* 16, 3017-3026.
- Yin, H.L., and Janmey, P.A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annual review of physiology* 65, 761-789.
- Yoon, H.S., Hajduk, P.J., Petros, A.M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., and Fesik, S.W. (1994). Solution structure of a pleckstrin-homology domain. *Nature* 369, 672-675.
- York, J.D. (2006). Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. *Biochimica et biophysica acta* 1761, 552-559.
- Zanoteli, E., Laporte, J., Rocha, J.C., Kretz, C., Oliveira, A.S., Mandel, J.L., Perez, A.B., Gabbai, A.A., and Buj-Bello, A. (2005). Deletion of both MTM1 and MTMR1 genes in a boy with myotubular myopathy. *American journal of medical genetics* 134, 338-340.
- Zhang, X., Jefferson, A.B., Auethavekiat, V., and Majerus, P.W. (1995). The protein deficient in Lowe syndrome is a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 5-phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4853-4856.
- Zhang, Y., Zolov, S.N., Chow, C.Y., Slutsky, S.G., Richardson, S.C., Piper, R.C., Yang, B., Nau, J.J., Westrick, R.J., Morrison, S.J., *et al.* (2007). Loss of Vac14, a regulator of the signaling lipid phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate, results in neurodegeneration in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17518-17523.



- Zhao, R., Qi, Y., Chen, J., and Zhao, Z.J. (2001). FYVE-DSP2, a FYVE domain-containing dual specificity protein phosphatase that dephosphorylates phosphatidylinositol 3-phosphate. *Experimental cell research* 265, 329-338.
- Zhao, R., Qi, Y., and Zhao, Z.J. (2000). FYVE-DSP1, a dual-specificity protein phosphatase containing an FYVE domain. *Biochemical and biophysical research communications* 270, 222-229.
- Zimmermann, P., Meerschaert, K., Reekmans, G., Leenaerts, I., Small, J.V., Vandekerckhove, J., David, G., and Gettemans, J. (2002). PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Molecular cell* 9, 1215-1225.
- Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., and Daum, G. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 173, 2026-2034.
- Zou, J., Chang, S.C., Marjanovic, J., and Majerus, P.W. (2009). MTMR9 increases MTMR6 enzyme activity, stability, and role in apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 284, 2064-2071.



## LA MUSIQUE DE LA REDACTION DE THESE

- Aerosmith – Devil’s Got A New Disguise (2006)  
 Aerosmith – Toys In The Attic (1975)  
 Agnes Obel – Philharmonics (2010)  
 Alabama Shakes - Boys And Girls (2012)  
 Alanis Morissette – Jagged Little Pill (1995)  
 Apparat - The Devil’s Walk (2011)  
 Arcade Fire - Neon Bible (2007)  
 Audioslave – Audioslave (2002)  
 Audioslave – Revelations (2006)  
 Bernhoft - Solidarity Breaks (2011)  
 Beth Jeans Houghton - Yours Truly, Cellophane Nose (2012)  
 Black Rebel Motorcycle Club – Baby 81 (2007)  
 Black Rebel Motorcycle Club – Beat The Devil’s Tattoo (2010)  
 Black Rebel Motorcycle Club – Howl (2005)  
 Bombay Bicycle Club - A Different Kind Of Fix (2011)  
 Broken Bells – Broken Bells (2010)  
 Brooke Fraser - Flags (2010)  
 Chairlift - Something (2012)  
 Crash Test Dummies - God Shuffled His Feet (1993)  
 Creedence Clearwater Revival – Creedence Clearwater Revival (1968)  
 Creedence Clearwater Revival – Willy And The Poor Boys (1969)  
 Dango Django - Dango Django (2012)  
 Eagles Of Death Metal – Death By Sexy (2006)  
 Ed Sheeran – “PLUS” (2011)  
 Eskobar - There’s Only Now  
 Feloche – La Vie Cajun (2010)  
 Fleetwood Mac – Rumours (1977)  
 Fleetwood Mac – The Essential Fleetwood Mac (2007)  
 Foo Fighters – Echoes, Silence, Patience & Grace (2007)  
 Foo Fighters – The Colour And The Shape (1997)  
 Foo Fighters – Wasting Light (2011)  
 Foster The People – Torches (2011)  
 Fun - Some Nights  
 Gossip - A Joyful Noise (2012)  
 Gotye - Making Mirrors (2011)  
 Graham Coxon A+E (2012)  
 Grizzli Bear - Veckatimest (2009)  
 Guns’n’Roses – Appetite For Destruction (1987)  
 Guns’n’Roses – Greatest Hits (2004)  
 Hanni El Khatib - Will The Guns Come Out (2011)  
 Jack White - Blunderbuss (2012)  
 Jeff Buckley - Grace (Legacy Edition) (2004)  
 Jehro – Jehro (2006)  
 Ludo - Prepare The Preparations (2010)  
 Marilyn Manson - Born Villain (2012)  
 Mark Lanegan - Blues Funeral (2012)  
 Michael Jackson - HIStory - Past, Present And Future (1995)  
 Miles Kane - Colour Of The Trap (2011)  
 Morcheeba – Dive Deep (2008)  
 Mother Love Bone - Apple (1990)  
 Mutemath - Mutemath (2006)  
 Mutemath - Odd Soul (2011)  
 Neil Young - Harvest (1972)  
 Neon Trees - Habits (2010)  
 Nine Inch Nails - All That Could Have Been (2002)  
 Nine Inch Nails - The Downward Spiral (1994)  
 Noah And The Whale - Peaceful The World Lays Me Down (2008)  
 Oasis – (What’s The Story) Morning Glory ? (2005)  
 Oasis – Don’t Believe The Truth (2005)  
 Oasis – Stop The Clocks (2006)  
 Oasis - Time Flies... 1994-2009 (2010)  
 Pearl Jam - Lost Dogs (2003)  
 Pearl Jam - Ten (1991)  
 Phoenix – United (2000)  
 Phoenix – Wolfgang Amadeus Phoenix (2009)  
 Pink Floyd – The Dark Side Of The Moon (1973)  
 Pink Floyd – The Division Bell (1994)  
 Queen – A Night At The Opera (1975)  
 Queen - Innuendo (1991)  
 Queen - The Game (1980)  
 R.E.M. – Automatic For The People (1992)  
 Radiohead – Hail To The Thief (2003)  
 Radiohead – OK Computer (1997)  
 Radiohead – Pablo Honey (1993)  
 Radiohead – The Bends (1995)  
 Red Fang - Red Fang (2009)  
 Red Fang - Murder The Mountains (2011)  
 RJD2 - Dead Ringer (2002)  
 Robert Francis – Before Nightfall (2010)  
 Sea Of Beas - Songs For The Ravens (2011)  
 Shaka Ponk - Bad Porn Movie Trax (2009)

- Shaka Ponk - The Geeks And The Jerkin' Socks (2011)
- Shaun Bartlett - Shrink The City To A Light (2008)
- She Keeps Bees - Dig On (2011)
- Shearwater - Animal Joy (2012)
- Silverchair - Neon Ballroom (1999)
- Silversun Pickups – Carnavas (2006)
- Silversun Pickups – Neck Of Woods (2012)
- Simple Minds – Black & White 050505
- Skip The Use - Skip The Use (2010)
- Soap And Skin - Narrow (2012)
- Soundgarden – Superunknown (1994)
- Stereophonics – Decade in the Sun (2008)
- Stereophonics – Language. Sex. Violence. Other? (2005)
- Stereophonics – Pull The Pin (2007)
- Stone Temple Pilots – Core (1992)
- Stone Temple Pilots - Shangri-La Dee Da (2001)
- Temple Of The Dog – Temple Of The Dog (1991)
- The Black Belles - The Black Belles (2011)
- The Black Keys – Attack And Release (2008)
- The Black Keys – Brothers (2010)
- The Black Keys – Chulahoma (2006)
- The Black Keys – El Camino (2011)
- The Black Keys - Magic Potion (2006)
- The Black Keys - Rubber Factory (2004)
- The Black Keys – The Big Come Up (2002)
- The Black Keys – Thick Freakness (2003)
- The Brian Jonestown Massacre – Tepid
- Peppermint Wonderland (2004)
- The Hickex Underworld - I'm Under The House, I'm Dying (2012)
- The Inspector Cluzo – The 2 mousquetaires (2012)
- The Inspector Cluzo – The French Bastards (2010)
- The Killers - Day & Age (2008)
- The Killers - Hot Fuss (2004)
- The Little Flames - The Day Is Not Today (2007)
- The Pineapple Thief - Someone Here Is Missing (2010)
- The Raconteurs - Broken Boy Soldiers (2006)
- The Raconteurs – Consolers Of The Lonely (2008)
- The Servant – How To Destroy A Relationship (2006)
- The Shins – Chutes To Narrow (2003)
- The Shins – Oh, Inverted World (2001)
- The Shins - Port Of Morrow (2012)
- The Shins – Wincing The Night Away (2007)
- The Smashing Pumpkins – Greatest Hits (2001)
- The Stone Roses - Second Coming (1994)
- The White Stripes – Elephant (2003)
- The White Stripes – Get Behind Me Satan (2005)
- The White Stripes – White Blood Cells (2001)
- The XX- XX (2009)
- Them Crooked Vultures – Them Crooked Vultures (2009)
- Thirteen Senses – Contact (2007)
- Thirteen Senses – Crystal Sounds (2010)
- Thirteen Senses – The Invitation (2004)
- Tom Waits – Mule Variations (1999)
- U2 – Achtung Baby (1991)
- U2 – All That You Can't Leave Behind (2000)
- U2 – The Joshua Tree (1987)
- Velvet Revolver – Contraband (2004)
- Velvet Revolver – Libertad (2007)
- Wise Blood - These Wings (2011)
- Yodelice – Tree Of Life (2009)



## Résumé

Des mutations dans les gènes codant pour des myotubularines (MTM) sont responsables de maladies neuromusculaires telles que la XLCNM (MTM1) ou la CMT4 (MTMR2 & MTMR13). Les MTMs sont des phosphatases à phosphosinositides (PPIn), des messagers lipidiques essentiels pour la régulation spatio-temporelle de fonctions cellulaires vitales.

La présence de 14 paralogues de MTMs chez l'Homme complique l'analyse de la fonction cellulaire d'un seul membre de la famille. La levure *Saccharomyces cerevisiae*, dont l'organisation cellulaire est comparable à une cellule humaine, ne compte en revanche qu'un seul homologue de *MTM* (*YMR1*), pour lequel nous disposons de mutants de délétion viables.

L'expression de MTM1 sauvage ou mutants de patients dans la levure montre seules les myotubularines enzymatiquement actives induisent une morphologie anormale du compartiment lysosomal et un défaut du trafic membranaires endocytique.

Nos résultats suggèrent que l'activité phosphatase de MTM1 ne serait pas à elle seule responsable de la XLCNM mais que d'autres mécanismes, tels que les interactions protéiques, pourraient prendre part au développement de la maladie

*Mots-clés* : *Saccharomyces cerevisiae*, myopathie, XLCNM, signalisation lipidique, trafic membranaire

## Abstract

Mutations in myotubularin (MTM) genes are responsible for neuromuscular diseases like the XLCNM (MTM1) or the CMT4B (MTMR2 & MTMR13). MTMs dephosphorylate phosphoinositides (PPIn), lipid messengers that play an essential role in the spatio-temporal regulation of critical cellular functions.

The presence of 14 MTMs paralogues in Human hinders the analysis of the cellular function of a single MTM family member. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* displays an intracellular organization that is similar to human cells and its genome encodes for only one myotubularin (*YMR1*) for which deletion mutants are available and viable.

The expression of MTM1 either wild-type or mutants from patients, in yeast, shows that only phosphatase-active myotubularins induce an abnormal morphology of the lysosomal compartment and a defect in the endocytic membrane trafficking.

Our results suggest that the catalytic activity of MTM1 isn't single-handedly responsible for XLCNM but that other mechanisms, such as protein-protein interactions, could take part in the development of the disease.

*Keywords* : *Saccharomyces cerevisiae*, myotubular myopathy, XLCNM, lipid signaling, membrane trafficking