



HAL
open science

Rôle du Ptdlns5P et de PIKfyve dans le contrôle de l'intégrité des granules plaquettaires

Rana Mansour

► **To cite this version:**

Rana Mansour. Rôle du Ptdlns5P et de PIKfyve dans le contrôle de l'intégrité des granules plaquettaires. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30089 . tel-01477613

HAL Id: tel-01477613

<https://theses.hal.science/tel-01477613>

Submitted on 27 Feb 2017

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Rana Mansour

Le vendredi 24 juin 2016

Titre :

Rôle du PtdIns5P et de PIKfyve dans le contrôle de l'intégrité
des granules plaquettaires

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Physiopathologie

Unité de recherche :

INSERM UMR 1048 - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Hélène Tronchère

Jury :

Pr. Pierre Sié, Président

Dr. Jean-Philippe Rosa, Rapporteur

Dr. Najet Debili, Rapporteur

Dr. Christophe Erneux, Invité

Dr. Hélène Tronchère, Directrice

Remerciements

Henry Ward Beecher disait « La reconnaissance est la plus belle fleur qui jaillit de l'âme »

Mes premiers remerciements vont naturellement à ma directrice de thèse Hélène Tronchère. Je la remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.

Je remercie également Najet Debili et Jean-Philippe Rosa d'avoir accepté la tâche de rapporteurs de ce manuscrit. Leur relecture attentive et leurs intéressantes remarques m'ont beaucoup apporté. Merci également à Christophe Erneux, et Pierre Sié d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, et ce malgré leur emploi du temps déjà bien chargé. Je leur suis reconnaissante du temps qu'ils m'ont accordé.

Je tiens à adresser un remerciement spécial à Bernard Payrastra. Des qualités scientifiques exceptionnelles mêlées d'une humanité extraordinaire font de Bernard la clef de voûte de cette équipe.

J'adresse toute ma gratitude à Frédérique Gaits Iacovoni alias « Fred Fred » qui a cru en moi et qui me poussait chaque jour vers le haut et m'interdisait de lâcher prise. Fred a cru au début que j'étais cette « fille calme et innocente » mais qui a vite reconnu la vérité. Les moments qu'on a passés ensemble sont pour la plupart des moments de folie que je n'oublierai jamais.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Sonia Severin. Sonia, tu étais présente dans les moments les plus difficiles et tu m'as aidé à surmonter la période la plus stressante de la thèse qui est l'écriture du manuscrit. Merci pour ton soutien et ton aide et pour le temps et l'énergie que tu as consacré et qui a contribué à l'avancement du projet.

Je remercie également Marie-Pierre Gratacap et Anne-Dominique Terrisse. Marie-Pierre merci pour le soutien tout au long de ces années et surtout pendant la dernière période. Anne Do en plus des discussions scientifiques que nous avons eues, j'ai pu partager avec toi de bons moments de convivialité.

JUJU ou Jus d'ananas ou même Julien, d'abord je voudrais te remercier pour ton immense patience face à mes bêtises. Tu as tout supporté toujours avec un grand sourire malgré le fait qu'il était évident que tu t'abstenais de t'énerver (ton fils t'a bien vengé). Je te remercie également pour tout le temps que tu as passé en essayant de m'apprendre les chansons et les films culte (même s'il m'en manque encore beaucoup).

Mes remerciements vont particulièrement à Lolo/Laurie. J'ai trouvé en toi une amie qui a été là du début jusqu'à la fin et surtout dans les moments les plus difficiles (parmi lesquels mon déménagement). Merci pour tous ces moments simples qui sont devenus inoubliables grâce à toi.

Merci de m'avoir motivé et écouté lorsque j'en avais besoin. Nous avons partagé de si bons moments avec Nico et Anaïs ainsi que notre petite bande (PA, Adrien et Marie). En gros, merci pour tout.

PA et Adrien les membres soudants de la bande, vous êtes parti en post doc et depuis nous n'avons plus fait nos soirées qui me manquent. Je vous remercie tous les deux pour les bons moments que nous avons passé ensemble. Adriano, ton humeur et ton sarcasme m'ont toujours fais rire et j'espère que tu garderas ce sens de l'humour même dans les situations les plus difficiles. Bon courage avec ton fils et j'espère qu'il va vous permettre à toi et à Marie de bien dormir pendant la nuit ! PA notre geek préféré, tout d'abord merci pour la surprise le jour de ma soutenance. Merci aussi pour toutes ces soirées et ces moments que nous avons pu partager et pour m'avoir consolé plein de fois face au team rocket.

En parlant de bande il ne faut pas oublier « l'oriental connexion » : Madjid, Abdul, Mouin, Elodie et Sara. Vous êtes mon groupe préféré pour les repas de midi, et j'ai passé de très bons moments avec vous. Nous avons mangé des glaces, cueilli des cerises et même des pissenlits et vous avez pu supporter toutes mes crises de folie. Je vous remercie donc pour ces agréables repas et moments. Sara, Abdul et Mouin je vous souhaite du courage pour votre thèse. Vous étiez toujours à coté de moi vers la fin et je suis reconnaissante pour cela. Elodie j'espère que tu trouveras un financement très bientôt et Madjid, un CDI sera le bienvenu !! Un petit coucou à Aïsha qui s'est joint au groupe vers la fin, je peux te confirmer : tu es encore pire que moi ! Tu comprends vite mais il faut t'expliquer longtemps Je te souhaite un bon M2 et une bonne continuation.

Je n'oublie évidemment pas mes amis et camarades doctorants de notre équipe, Colin, Marie et Fanny avec lesquels j'ai partagé tous ces moments de doute et de plaisir. Fanny et Marie je vous remercie pour toutes ces pauses thé et surtout pour le soutien que vous m'avez donné la dernière période. Colin, tu es une personne attentionnée et j'ai vraiment apprécié les moments où tu m'encourageais et tu me soutenais. Tu as aussi pu supporter mes bêtises toujours avec le sourire et je te remercie pour ça. Je vous souhaite à vous trois du courage pour votre thèse surtout Marie et Colin qui sont dans les derniers mois.

Grominou/Romain je te remercie pour tous les moments où tu m'as écouté, pour les moments où on a discuté de tout et de n'importe quoi et surtout les moments que tu as passé pour m'apprendre les chansons cultes.

Je tiens également à remercier Gaëtan qui à cause de son travail rigoureux et minutieux m'a permis d'acquérir des méthodes efficaces et simplifiées dans la vie du labo ainsi que dans les techniques scientifiques.

Jean-Marie je te suis reconnaissante pour toute l'aide que tu m'as fourni dans les manips. Je te remercie également pour les longues discussions que nous avons eu que ce soit à propos du labo ou autre.

Ashraf, le grand chef, tu m'as considéré comme « ta fille adoptive » et tu m'as chouchouté tout au long de cette thèse. Je te remercie pour cela et pour ta gentillesse. Je dois t'avouer que ta phrase préférée « la vie c'est une grosse merde » est devenue mon slogan :)

Pour clôturer avec l'équipe j'aimerais remercier les médecins qui ont fait leurs stages avec nous et que j'apprécie énormément. Je cite les personnes qui m'ont marquées le plus : Marine, Alexandra, Thomas, et Jean. Je vous remercie de votre gentillesse et des discussions que nous avons eues ensemble. Un remerciement encore plus spécial à Jean qui a squatté MON bureau et qui grâce à lui et à ses discussions m'a permis de surmonter une période très stressante de fin de thèse. Merci aussi pour toute l'aide sur Adobe Photoshop, et surtout surtout sur l'apprentissage du prélèvement sanguin. Tu étais un bon cobaye (Abdul aussi) et tu t'es sacrifié plusieurs fois et je te remercie pour cela.

En plus de notre équipe, je tiens à exprimer ma gratitude à plusieurs personnes du monde de la recherche parmi lesquels Muriel, Steph, Véro, Nicole, Laetitia, Thibault et Michel. Souad, tu es une personne généreuse, attentionnée et sincère. Ca m'a fait plaisir de te connaître et de te côtoyer et je ne te souhaite que du bonheur.

Je tiens à saluer et à encourager les autres thésards : Adrien, Guillaume, Steven, Yohan, Marion, Nicola, Caterina et Roberto. Loubina bon courage à toi aussi même si tu n'es plus en thèse.

Un très grand merci à Anne Mazars qui m'a aidé et soutenu depuis son arrivée et qui a été là pour moi pendant la dernière période. Tu es quelqu'un d'aimable et j'apprécie beaucoup ton honnêteté et ta gentillesse.

Les résultats obtenus durant la thèse ne sont pas les fruits d'une seule personne, je tiens donc à remercier les plateaux de microscopie et de cytométrie. Merci particulièrement à Madjid Zanoun (encore une fois) mais aussi à Romina D'Angelo pour l'aide et la formation aux microscopes et merci pour Christiane Pêcher et Alexia Zakaroff pour leur aide et leurs conseils au cytomètre.

Je tiens à remercier également deux personnes qui m'ont encouragé depuis mon M1 et qui m'encouragent toujours Paola Romagnoli et Joost van Meerwijk. Vous m'avez appris à aimer la recherche et le domaine de la recherche et je vous suis très reconnaissante. Vous m'avez guidé dans mon « enfance scientifique » et votre rigueur et vos conseils ont raisonné en moi tout au long de mon parcours.

Mes remerciements vont aussi à mes amis et tout particulièrement à Farah S. Farah, merci...c'est un mot trop simple. Ce que je souhaiterais exprimer est au dessus de cela. Je suis à la fois touchée et reconnaissante pour l'aide que tu m'as apportée, pour ta gentillesse et tout simplement pour ton amitié. Et je ne pourrai jamais te remercier assez. En parlant d'amis, je remercie aussi les trois personnes qui sont toujours là pour moi depuis six ans maintenant : Mohamad, Ahmad et Sadek. Je remercie également Farah Z, Laure, Nicolas, Roxana, Ali, Mahmoud, Darine et Amar pour leur amitié sans faille.

Enfin, mes derniers remerciements iront à ma famille. A mes parents tout d'abord, sans qui l'enfant que j'étais ne serait pas devenu la personne que je suis. C'est avec émotion qu'à mon tour je leur dévoile le fruit de mes efforts. J'espère être à la hauteur de leur fierté inconditionnelle. A mes frères et ma sœur que j'aime de tout mon cœur et qui forment le point d'ancrage de ma vie. Vous avez toute ma reconnaissance et ma gratitude.

Un énorme MERCI pour des personnes tout simplement géniales ! Qu'aurais-je fais si vous n'étiez pas là? Assurément pas grand chose !

Résumé

Les plaquettes jouent un rôle primordial dans le processus d'hémostase. Elles sont générées à partir des mégacaryocytes (MK) présents dans la moelle osseuse. En plus des compartiments vésiculaires classiques de la voie d'endocytose et de dégradation vers les lysosomes, les plaquettes possèdent deux compartiments sécrétoires additionnels, les granules alpha et denses. Ces granules sont générés au cours de la maturation des MK à partir des corps multivésiculaires (MVB) et contiennent des molécules essentielles aux fonctions plaquettaires. Un défaut dans la production ou le remplissage de ces granules est à l'origine de syndromes hémorragiques. Malgré des études montrant l'implication de certaines protéines du trafic vésiculaire, les mécanismes moléculaires qui contrôlent la biogenèse et la maintenance des granules plaquettaires dans les MK, ainsi que les mécanismes de tri des cargos qu'ils contiennent, ne sont pas complètement élucidés. Au cours de ces dernières années les phosphoinositides (PI) sont apparus comme des acteurs majeurs du trafic vésiculaire en régulant la localisation de nombreuses protéines. Cependant, peu de choses sont connues à ce jour quant au rôle de ces lipides dans la biogenèse et le trafic des granules plaquettaires dans les MK.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le rôle d'un des membres de la famille des PI, le phosphatidylinositol 5-phosphate (PtdIns5P), ainsi que deux enzymes responsables de sa synthèse : la 3-phosphatase MTM1 (mutée dans la myopathie centronucléaire, CNM) et la lipide kinase PIKfyve, dans le contrôle de la dynamique des granules. Mes résultats montrent que MTM1 est présente dans les MK et les plaquettes et est localisée en partie sur les granules denses. Cependant, cette phosphatase n'est pas essentielle pour la production et l'activation plaquettaire. En effet, les souris MTM1 KO ne présentent pas de défaut du nombre plaquettaire, ni d'agrégation et de sécrétion suite à une stimulation par la thrombine ou le collagène. La mise en évidence d'autres membres de la famille des myotubularines dans les plaquettes et les MK différenciés pourrait expliquer une redondance de fonction. De façon intéressante, mes données montrent que la détection de MTM1 à partir de faible quantité de sang (<100 µl) pourrait déboucher sur la mise au point d'un test diagnostique rapide pour la détection de la CNM. Mes travaux ont été focalisés par la suite sur la kinase PIKfyve. En utilisant la lignée leucémique mégacaryoblastique MEG-01 différenciée, je montre pour la première fois que le PtdIns5P est localisé dans les compartiments endosomes tardifs ainsi que dans les granules alpha et denses. Dans ces cellules, PIKfyve contrôle 75% du PtdIns5P. De façon remarquable, l'inhibition

pharmacologique de PIKfyve ou son invalidation par siRNA entraîne une perte d'identité des granules avec la formation de granules élargis, qui présentent à la fois des marqueurs de granules denses et alpha et bloque totalement leur mobilité. Ces données ont été confirmées dans des MK primaires de souris. L'addition de PtdIns5P exogène sur les MEG-01 restaure le phénotype normal des granules. Ceci démontre que PIKfyve, par l'intermédiaire du PtdIns5P, contrôle l'intégrité des granules, qui est donc un phénomène actif et les mécanismes de fusion/fission des vésicules affectant le tri des cargos. De plus, l'inhibition de PIKfyve dans les plaquettes isolées affecte leur agrégation et leur sécrétion, montrant que PIKfyve et le PtdIns5P peuvent agir d'une part, lors de la biogénèse des plaquettes dans les MK et d'autre part, dans les mécanismes d'activation des plaquettes.

Dans leur ensemble, mes travaux placent PIKfyve et son produit lipidique, le PtdIns5P, comme des acteurs majeurs de la maintenance et l'identité des granules plaquettaires.

Abstract

Platelets play a major role in homeostasis processes. They are generated from megakaryocytes (MKs) in the bone marrow. In addition to the classic vesicular compartments of the endocytic and degradation pathway toward lysosomes, platelets have two additional specialized secretory compartments, the dense and alpha granules. These granules are made during MK maturation from multivesicular bodies (MVB) and contain molecules that are essential to platelet functions. Defect in the production of these granules or absence of their cargos is the cause of hemorrhagic syndromes. Despite many studies showing the implication of vesicle trafficking proteins, the molecular mechanisms controlling the biogenesis and maintenance of the granules and cargo sorting are not completely understood. In recent years, phosphoinositides (PIs) have emerged as key actors in vesicular trafficking playing a role of important spatial regulators of many proteins. However, little is known about the role of these lipids in the biogenesis and the trafficking of platelet granules in the MK.

During my thesis, I have studied the role of one the member of the PI family, the phosphatidylinositol 5-phosphate (PtdIns5P), and of two enzymes responsible of its synthesis : the 3-phosphatase MTM1 (mutated in the Centronuclear myopathy, CNM) and the lipid kinase PIKfyve, in the control of granules dynamic. My results show that MTM1 is present in MK and platelet and that platelet MTM1 localizes in part on dense granules. However, the phosphatase is not mandatory for platelet production and activation. Indeed, MTM1 knock-out in mice has no effect on platelet count, aggregation and secretion following thrombin or collagen stimulation. The detection of other members of the myotubularins family in platelet and differentiated MK could explain a redundancy in functions. Interestingly, my data show that MTM1 detection from small amount of blood (<100 μ l) could lead to the development of a rapid diagnostic test for the detection of the CNM. The second part of my work was focalized on the lipid kinase PIKfyve. Using the differentiated leukemic megakaryoblastic cell line MEG-01 as a cell model, I showed for the first time that PtdIns5P is localized on late endosome and on alpha and dense granules. In these cells, PIKfyve controls 75% of cellular PtdIns5P. Remarkably, pharmacological inhibition of PIKfyve or its invalidation by siRNA leads to a loss of granules identity with the formation of enlarged granules containing both alpha and dense granules markers, and totally blocks their mobility. These data were also confirmed on mice primary MK. Addition of exogenous PtdIns5P

on MEG-01 cells restores the normal phenotype of granules showing that PIKfyve, via PtdIns5P, controls granules integrity, an active phenomenon, and the fusion/fission mechanisms that affect cargos sorting. Furthermore, PIKfyve inhibition in isolated platelet affects their aggregation and secretion, showing that PIKfyve and the PtdIns5P may act on the biogenesis of platelets in MK and also on the mechanisms that control mature platelets activation.

In conclusion, my Ph.D. work shows that PIKfyve and its product PtdIns5P are major actors in platelet granules maintenance and integrity.

Table des matières

Abreviations	4
Index des figures	8
Introduction	9
Les plaquettes sanguines	10
I. Généralités	10
II. Fonctions plaquettaires	11
II.1 Recrutement et activation des plaquettes.....	12
III. Plaquette et pathologies	14
III.1 Plaquettes et thrombose	14
III.2 Plaquettes et inflammation.....	15
III.3 Plaquettes et cancers	16
La mégacaryopoïèse	18
I. Hématopoïèse	18
II. Mégacaryopoïèse	20
II.1 Régulation de la mégacaryopoïèse	21
II.2 Endomitoses.....	25
II.3 Le système de membrane de démarcation (DMS).....	26
II.4 Formation des proplaquettes.....	28
Les granules des mégacaryocytes et des plaquettes	29
I. Généralité	29
II. Les granules alpha	30
II.1 Biogenèse des granules alpha	30
II.2 Défauts de granules alpha	32
III. Les granules denses	36
III.1 Biogenèse des granules denses	37
III.2 Défauts des granules denses.....	38
IV. Les mécanismes de libération des granules	41
Les phosphoinositides	44
I. Introduction générale	44

II. Les enzymes du métabolisme du PtdIns5P	46
II.1 Les phosphoinositide 3-phosphatases	46
II.2 La PIP 5-kinase de type III : PIKfyve.....	47
III. Rôle et localisation des phosphoinositides	60
III.1 PtdIns3P	60
III.2 PtdIns(3,5)P ₂	61
III.3 PtdIns5P	62
Objectifs	66
Résultats Expérimentaux.....	67
Article 1 : Expression des myotubularines dans les plaquettes ; caractérisation et diagnostic potentiel des myopathies myotubulaires	68
I. Contexte scientifique :	68
II. Publication acceptée à BBRC :	69
III. Conclusion :.....	77
Article 2 : Rôle de PIKfyve et du PtdIns5P dans la dynamique et l'intégrité des granules plaquettares	78
I. Contexte scientifique :	78
II. Publication en préparation :.....	79
III. Conclusion :.....	119
IV. Résultats complémentaires	120
Article 3 : TOM1 is a PI5P effector involved in the regulation of endosomal maturation..	123
I. Contexte scientifique :	123
II. Article publié à Journal of Cell Science	124
III. Conclusion :.....	138
Discussion et perspectives	139
Discussion :.....	140
I. Détection et rôle de la myotubularine MTM1 dans les plaquettes	140
II. Rôle du PtdIns5P dans la biogenèse et le maintien des granules plaquettares.....	142
III. Rôle de PIKfyve dans les plaquettes	145
Perspectives :	147
I. Rôle des enzymes du métabolisme du PtdIns5P et du PtdIns(3,5)P₂	147

II. Rôle de PIKfyve dans la mégacaryopoïèse et dans les plaquettes.....	148
III. Rôle du PtdIns5P et de PIKfyve dans le déplacement des granules	150
Bibliographie.....	152
Annexe	183

Abbreviations

A

ADCNM : Autosomal dominant centronuclear myopathy

ADP : Adenosine di-phosphate

Akt : Protein kinase B

AML1 : Acute Myeloid Leukemia 1

AP : Adaptor protein complex

ARC : Arthrogyrosis, renal dysfunction and cholestasis

ArPIKfyve : Associated regulator of PIKfyve

ATP : Adenosine tri-phosphate

B

BEACH : Beige and Chediak-Higashi

BLOC : Biogenesis of lysosome-related organelle complexes

C

Cav1.2 : Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit

CD40L : Cluster of differentiation 40 ligand

Cdc42 : Cell division cycle 42

CDK1 : Cyclin-dependent kinase 1

CFD : Corneal fleck dystrophy

CHS : Chediak-Higashi syndrome

CI-MPR : Cation independent mannose 6-phosphate Receptor

CIP4 : Cdc42 interacting protein 4

CLP : Common lymphoid progenitor

CMP : Common myeloid progenitor

c-MPL : Thrombopoietin Receptor

CMT4 J : Charcot-Marie-Tooth 4 J

Cti6 : P Antigen Family, Member 5

Cul3 : Cullin-based ubiquitin ligases

CXCL7 : C-X-C chemokine ligand 7

CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4, SDF-1 receptor

D

DMS : Demarcation membrane system

DNM2 : Dynamin 2

E

EEA1 : Early Endosome Antigen 1

EGFR : Epidermal growth factor receptor

EGF : Epidermal growth factor

EPO : Erythropoietin

EpoR : Erythropoietin receptor

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

F

F-BAR : Fes/CIP4 homology and bin/amphiphysin/Rsv

FGF-4 : Fibroblast growth factor 4

FHL : familial hemophagocytic lymphohistiocytosis

FIG4 : Phosphoinositide 5-Phosphatase

FLI-1 : Friend Leukemia Virus Integration 1

FLT-3 : Fms-Related Tyrosine Kinase 3

FOG-1 : Friend Of GATA 1

FYVE : Fab 1 (yeast orthologue of PIKfyve), YOTB, Vac 1 (vesicle transport protein), and EEA1

G

GATA-1 : Globin Transcription Factor 1

G-CSF : Granulocyte colony-stimulating factor

GFI1b : Growth Factor Independence-1B

GLUT4 : Glucose transporter type 4

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GP : Glycoprotein

GPS : Gray platelet syndrome

GRAM : Glucosyltransferases, Rab-like GTPase activators and Myotubularins

H

HB-EGF: Heparin-binding EGF-like growth factor

HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor 1, Alpha Subunit

HPC : Hematopoietic progenitor cell

HPLC : High performance liquid chromatography

HPS : Hermansky-Pudlak syndrome

HSC : Hematopoietic stem cell

I

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1

IL : Interleukine

ILV : Intra-luminal vesicles

ING2 : Inhibitor of growth 2

J

JAK : Janus Kinase

JLP : C-Jun NH2-Terminal Kinase-Associated Leucine Zipper Protein

K

KO : Knockout

L

LAMP : Lysosomal-associated membrane protein

LRO : Lysosome related organelle

LT-HSC : Long-term hematopoietic stem cell

LYST : Lysosomal trafficking regulator

M

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor

MK : Megakaryocyte

MTM1 : Myotubularin 1

MTMR : Myotubularin Related Protein

Munc : mammalian uncoordinated

MVB : Multivesicular bodies

MYB : V-Myb Avian Myeloblastosis
Viral Oncogene Homolog

MYH10 : Non-muscle myosine IIB

N

NBEAL2 : Neurobeachin like 2

NF-E2 : Nuclear Factor, Erythroid 2

NK : Natural killer

NO : Nitric oxide

NPM-ALK : Nucleophosmin-anaplastic
lymphoma kinase

O

OCS : Open canalicular system

P

PAR : Protease-activated receptors

PAS : PIKfyve-ArPIKfyve-Sac3

PDGF : platelet derived growth factor

PF4 : Platelet factor 4

PH : Pleckstrin homology

PHD : Plant homeo domain

PI : Phosphoinositide

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PIKfyve : Phosphoinositide Kinase,
FYVE Finger Containing

PKB : Protein kinase B

PPT : Proplatelet

PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-
1

PtdIns : Phosphatidylinositol

PtdIns(3,4)P₂ : Phosphatidylinositol 3,4-
biphosphate

PtdIns(3,4,5)P₃ : Phosphatidylinositol
3,4,5-triphosphate

PtdIns(3,5)P₂ : Phosphatidylinositol 3,5-
biphosphate

PtdIns3P : Phosphatidylinositol 3-
monophosphate

PtdIns4P : Phosphatidylinositol 4-
monophosphate

PtdIns5P : Phosphatidylinositol 5-
monophosphate

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

PU.1 : Spi-1 Proto-Oncogene

PX : Phox homology

R

Rab : Member RAS Oncogene Family

Rac1 : Ras- related C3 botulinum toxin
substrate 1

Rho : Ras homologous

ROC-kinase : Rho-associated kinase

RUNX : Runt-Related Transcription
Factor

S

Sac : Suppressor of actin

Sac3 : SAC domain-containing protein 3

SCF : Stem cell factor

SDF-1 : Stromal cell-derived factor 1

SGK1 : Serum and glucocorticoid
inducible kinase

SH3 : SRC homology 3

SHIP1 : Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase D

SHPTP-2 : Protein-Tyrosine Phosphatase 2C

SLC35D3 : Solute Carrier Family 35, Member D3

SNAP : SNF-associated protein

SNARE : soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment protein receptor

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

ST-HSC : Short-term hematopoietic stem cell

STX : Syntaxin

T

TGF : Transforming growth factor

TGN : Trans Golgi network

TLR : Toll-like receptors

TOM1 : Target Of Myb-1

TPO : Thrombopoietin

TRPML-1 : Transient receptor potential mucolipin 1

TRPV6 : Transient receptor potential cation channel

t-SNARE : Target SNARE

Tup1 : Histone cell cycle regulator

TXA2 : Thromboxane A2

TYK : Tyrosine kinase

V

VAMP : Vesicle-associated membrane protein

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VHS : VPS-27, Hrs and STAM

VIPAR : VPS33B Interacting Protein, Apical-Basolateral Polarity Regulator, Spe-39 Homolog

VPS : Vacuolar protein sorting

v-SNARE: Vesicle SNARE

vWF : von Willebrand Factor

W

WASp : Wiskott-Aldrich syndrome protein

WAVE : WASP-family verprolin-homologous protein

X

XLCNM : X-linked CentroNuclear Myopathy

Index des figures

Figure 1 : Les compartiments sécrétoires des plaquettes

Figure 2 : Images de plaquettes humaines

Figure 3 : Formation d'un agrégat plaquettaire au site de lésion vasculaire

Figure 4 : Représentation schématique simplifiée de l'hématopoïèse

Figure 5 : Représentation schématique des HSC dans la moelle osseuse

Figure 6 : Illustration des étapes de différenciation d'un MK en plaquette

Figure 7 : Représentation schématique des mécanismes moléculaire induits par la TPO

Figure 8 : Modèle proposé montrant la formation des granules alpha dans les MK

Figure 9 : Images de plaquettes témoin et de GPS

Figure 10 : Microscopie électronique représentant des plaquettes d'un donneur sains et d'un patient ARC

Figure 11 : Modèle de formation des granules denses dans les MK

Figure 12 : Les complexes impliqués dans la formation des granules denses

Figure 13 : Microscopie électronique montrant des plaquettes avec des granules denses normaux et des granules HPS

Figure 14 : Microscopie électronique montrant des plaquettes d'un patient CHS

Figure 15 : Schéma montrant l'exocytose des granules

Figure 16 : Modèle montrant la sécrétion des granules plaquettaires

Figure 17 : Famille des phosphoinositides

Figure 18 : Représentation schématique de PIKfyve et des divers domaines qui la composent

Figure 19 : Fonctions de PIKfyve et de ses produits le PtdInsP et le PtdIns(3,5)P₂

Figure 20 : Différentes fonctions du PtdIns5P

Figure 21 : Disparition des vésicules élargies par le PtdIns(3,5)P₂ et le PtdIns5P.

Figure 22 : La combinaison du PtdIns(3,5)P₂ et du PtdIns5P reverse rapidement le phénotype des vésicules élargies.

Figure 23 : Temps d'occlusion de la carotide suite à une lésion par le FeCl₃.

Introduction

Les plaquettes sanguines

I. Généralités

Les plaquettes sanguines sont des cellules anucléées produites par la fragmentation des mégacaryocytes (MK). Ces petites cellules de forme discoïde circulent à raison de 150 000 à 350 000 plaquettes par μl de sang. Lors d'une blessure de la paroi vasculaire, elles interagissent très rapidement avec le sous-endothélium et s'activent afin de prévenir les saignements. Elles perdent leur forme discoïde et deviennent sphériques en émettant de longs filopodes facilitant leur adhérence puis s'étalent et agrègent pour former un clou plaquettaire suffisant pour arrêter les saignements des capillaires et de petits vaisseaux (Semple et al., 2011). L'étude de la morphologie des plaquettes par microscopie électronique a permis de distinguer trois constituants majeurs : i) la membrane plasmique avec un système canaliculaire ouvert (OCS), ii) le cytosquelette et iii) les différents organites intracellulaires (Thon and Italiano, 2012). L'OCS correspond à des invaginations profondes de la membrane plasmique et est en continuité avec la surface cellulaire. Il contribue à la captation des éléments externes dans les plaquettes et à la libération du contenu des granules lors de leur activation. Ce système sert surtout de réservoir membranaire durant le changement de forme des plaquettes (van Nispen tot Pannerden et al., 2010).

La membrane plasmique est soutenue par un cytosquelette très développé, constitué de microtubules et de microfilaments d'actine (Thon and Italiano, 2012). Il joue un rôle important dans la biologie des plaquettes et plus spécifiquement dans le maintien et le changement de forme des plaquettes au cours de l'activation et de l'agrégation. Il contribue aussi au relargage du contenu des granules.

Le cytoplasme des plaquettes contient de nombreux organites, en particulier quelques mitochondries, des grains de glycogène, des granules alpha et denses et des lysosomes (Figure 1). Lors de l'activation plaquettaire, le contenu des granules est sécrété et un certain nombre de protéines spécifiques des granules se retrouvent à la surface des plaquettes et sont utilisées, en cytométrie de flux, comme marqueurs de la sécrétion.

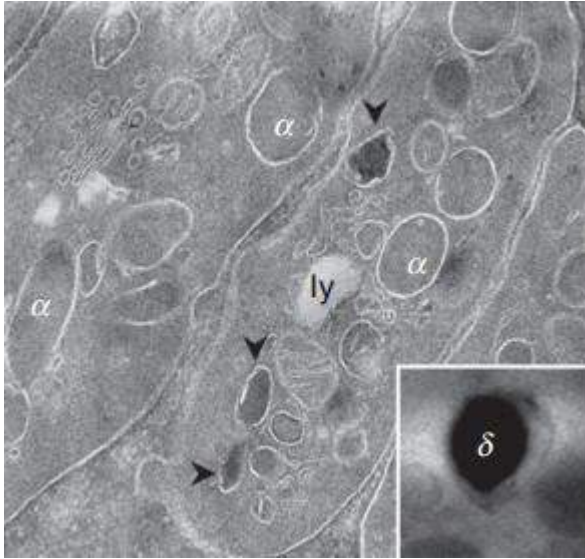


Figure 1 : Les compartiments sécrétoires des plaquettes : granules alpha (α), granules denses (δ et flèche) et lysosomes (ly). (D'après Heijnen et al., 2015)

II. Fonctions plaquettaires

L'hémostase est un processus physiologique qui permet de maintenir la fluidité du sang et d'empêcher les saignements lors d'une lésion vasculaire. Elle est assurée par deux grands systèmes intimement liés; la cascade de coagulation et l'activation plaquettaire. Les maladies thrombotiques qui peuvent être considérées comme une déviation pathologique de l'hémostase impliquent aussi le système de la coagulation sanguine et l'activation plaquettaire. La thrombose est caractérisée par la formation d'un thrombus intravasculaire qui peut conduire à l'occlusion partielle ou totale du vaisseau et à des phénomènes ischémiques (Engelmann and Massberg, 2013). Dans des conditions physiologiques normales, les plaquettes circulent à proximité de l'endothélium sans qu'elles n'interagissent durablement avec lui. Ceci est dû aux propriétés anti-thrombotiques de l'endothélium sain qui sécrète des molécules antiagrégantes (prostacyclines, NO). Par contre, lors d'une lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent rapidement aux sites lésés pour former un thrombus plaquettaire permettant de prévenir les saignements. Ce processus est dépendant de la capacité d'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale, ainsi qu'à leur faculté à changer de forme rapidement, à s'étaler, sécréter, agréger et développer une activité procoagulante (Kaplan and Jackson, 2011) (Figure 2).



Figure 2 : Images de plaquettes humaines. De gauche à droite, plaquettes au repos, plaquettes partiellement activées et plaquettes activées qui commencent à s'agréger. (cover photo of December 19th, *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (51)).

II.1 Recrutement et activation des plaquettes

Lors d'une lésion vasculaire, le sous-endothélium riche en fibrilles de collagène, fibronectine et laminine est exposé à la circulation sanguine. Le facteur de von Willebrand (vWF) circulant interagit alors rapidement avec le collagène et sous l'effet des forces de cisaillement imprimées par le flux sanguin, expose son site de haute affinité pour le complexe glycoprotéique GPIb/IX/V plaquettaire et plus particulièrement pour la sous-unité GPIb α de ce complexe. Cette interaction GPIb α /vWF permet aux plaquettes de ralentir et de rouler (*rolling*) sur la surface lésée facilitant ainsi la liaison au collagène via l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (GPIa/IIa) et la glycoprotéine GPVI. Les fortes forces de cisaillement rencontrées dans le secteur artériel et dans les capillaires jouent un rôle majeur dans le recrutement des plaquettes via le vWF et le complexe GPIb/IX/V (Savage et al., 1996). D'autres intégrines plaquettaires contribuent à l'adhésion des plaquettes, notamment, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ qui lie la fibronectine et l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ qui lie la laminine (Santoro, 1986; Moroi et al., 1997; Nieswandt and Watson, 2003; Jackson, 2007; Ruggeri, 2009;). Lorsqu'elle est activée par un processus de signalisation dit « inside-out » l'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$, très exprimée à la surface des plaquettes, lie avec une forte affinité le fibrinogène et joue un rôle clé dans l'agrégation plaquettaire (Li et al., 2010). L'intégrine $\alpha \text{IIb}\beta 3$ activée est capable d'interagir avec d'autres molécules d'adhésion telles que la

thrombospondine, la fibrine et la fibronectine (Ni et al., 2000) et également avec le vWF pour contribuer à une adhésion stable des plaquettes (Ruggeri et al., 1982; Hantgan, 1988; Kulkarni et al., 2000; Jackson, 2007).

Lors de leur activation, les plaquettes vont sécréter et produire de nombreux médiateurs qui vont permettre l'induction d'une boucle d'amplification de l'activation. Parmi ces médiateurs on trouve le thromboxane A2 (TXA2), dérivé de l'acide arachidonique, et l'ADP stocké dans les granules denses. Ces agonistes vont agir de façon autocrine et paracrine afin d'amplifier l'activation des plaquettes et le recrutement de nouvelles plaquettes en engageant des récepteurs spécifiques couplés aux protéines G hétérotrimériques, les P2Y1 et P2Y12 pour l'ADP (Jin et al., 1998; Hollopeter et al., 2001) et le TP α et TP β pour le TXA2 (Huang et al., 2004).

Les plaquettes sont également fortement activées par la thrombine produite par le biais de la cascade de la coagulation initiée par l'exposition du facteur tissulaire présent dans les couches profondes de la paroi du vaisseau. La thrombine est l'un des agonistes les plus puissants des plaquettes et agit par activation de ses récepteurs PAR (protease-activated receptors), plus précisément PAR1 et PAR4 chez l'homme, par clivage protéolytique (Coughlin, 1999). De plus, la thrombine clive le fibrinogène, permettant sa polymérisation en fibrine, ce qui contribue à la stabilisation du thrombus (Kaplan and Jackson, 2011).

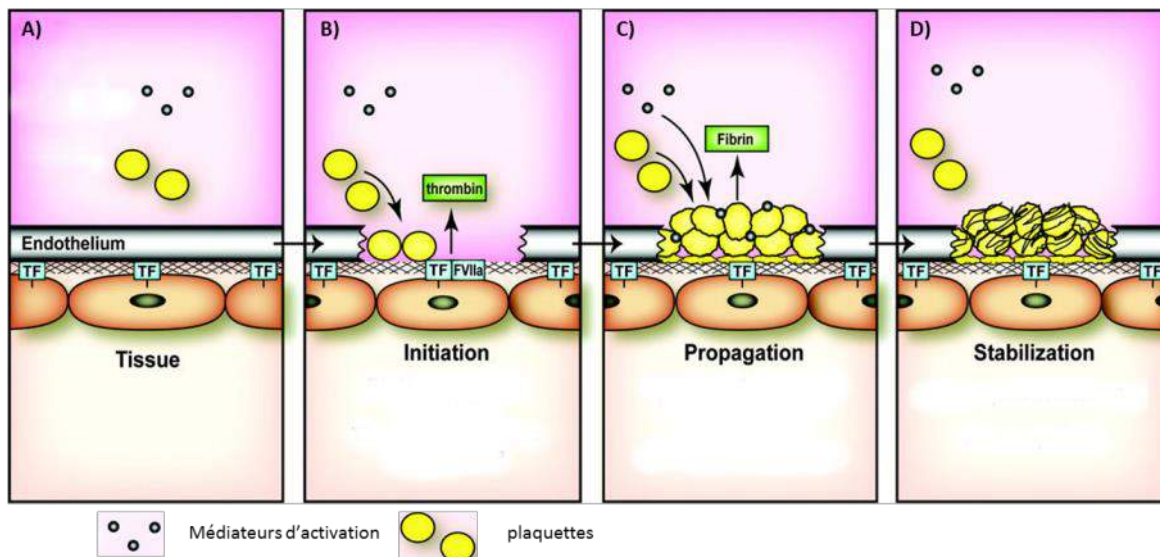


Figure 3 : Formation d'un agrégat plaquettaire au site de lésion vasculaire. A) les plaquettes au repos circulent dans le sang à proximité de l'endothélium. B) suite à une lésion vasculaire les plaquettes interagissent rapidement avec le sous-endothélium, de plus le facteur tissulaire des couches profondes de la paroi vasculaire active la cascade de coagulation conduisant à la production de thrombine qui est un puissant activateur des plaquettes C) les plaquettes s'activent,

subissent un changement de morphologie, produisent des médiateurs d'activation permettant de recruter d'autres plaquettes au site de lésion et agrègent. D) sous l'action de la thrombine, le fibrinogène est transformé en polymères de fibrine qui consolident le thrombus. (D'après Mackman et al., 2007).

III. Plaquette et pathologies

Le rôle clé des plaquettes dans l'hémostase et la thrombose est décrit depuis de nombreuses années (Schulze, 1865; Bizzozero, 1882) et de multiples cibles thérapeutiques ont été identifiées et exploitées dans le développement de médicaments antithrombotiques. Les travaux publiés ces dernières années montrent cependant que le rôle des plaquettes ne se confine pas au maintien de l'intégrité vasculaire et à la thrombose puisqu'elles jouent un rôle important dans l'inflammation, la dissémination cancéreuse, la cicatrisation et la séparation des vaisseaux sanguins et lymphatiques lors du développement. J'évoquerai brièvement certaines fonctions physiopathologiques des plaquettes.

III.1 Plaquettes et thrombose

La thrombose se définit par l'occlusion d'un vaisseau sanguin par un caillot. Elle peut être attribuée à une coagulation anormale du sang ou une hypercoagulabilité suite par exemple à la rupture d'une plaque d'athérosclérose. Une perturbation du flux sanguin, une lésion de l'endothélium vasculaire ou une modification dans les composants du sang favorisent la thrombose et sont regroupés sous le terme de "triade de Virchow" (Bennett et al., 2009; Wolberg et al., 2012). Le processus thrombotique peut affecter les artères et les veines et est la principale cause de décès dans le monde (Engelmann and Massberg, 2013). Aux Etats-Unis, plus de 2000 patients décèdent chaque jour à cause de la formation d'un caillot artériel cérébral ou coronaire provoquant respectivement un accident vasculaire cérébral et un infarctus du myocarde (Roger et al., 2011). Les plaquettes jouent un rôle clé dans les thromboses artérielles alors que la cascade de coagulation est en première ligne dans les thromboses veineuses, bien que les plaquettes interviennent également. Les mécanismes d'adhésion des plaquettes sur les vaisseaux endommagés ont été largement étudiés et sont à présent assez bien définis (Jackson, 2007; Kaplan and Jackson, 2011; Ivanciu and Stalker, 2015).

La majorité des thromboses artérielles est déclenchée par fissuration ou rupture d'une plaque d'athérosclérose exposant au sang un matériel très thrombogène conduisant à l'athérombose (Badimon and Vilahur, 2014). L'utilisation de nombreux modèles de souris transgéniques et la modélisation de la formation d'un thrombus plaquettaire *ex-vivo* en condition de flux artériel normal ou pathologique ont permis de mieux comprendre l'enchaînement des réactions moléculaires très complexes qui conduisent à la formation d'un thrombus plaquettaire stable. Plusieurs revues générales récentes résument les connaissances actuelles (Jackson, 2011; Cosemans et al., 2013; McFadyen and Jackson, 2013; Geddings and Mackman, 2014; Wisler and Becker, 2014).

Les plaquettes sont donc une cible majeure dans la prévention des thromboses artérielles et des phénomènes ischémiques qu'elles génèrent. L'aspirine et les antagonistes du récepteur P2Y₁₂ de l'ADP sont des médicaments très largement prescrits chez les patients à risque de thrombose artérielle (Siddiqui et al., 2013).

Des études récentes ont montré l'implication de cellules de l'immunité innée dans la thrombose artérielle, en particulier les monocytes et les neutrophiles qui ont la capacité d'amplifier l'activation plaquettaire et la formation de fibrine (Engelmann and Massberg, 2013). Les cellules immunitaires jouent notamment un rôle clé dans les thromboses associées au cancer, ou à une inflammation forte (Karachaliou et al., 2015; Saghazadeh and Rezaei, 2016).

III.2 Plaquettes et inflammation

Les plaquettes influencent l'inflammation et la réponse immunitaire innée à plusieurs niveaux (Ghasemzadeh and Hosseini, 2013; Huang and Chang, 2012; Semple et al., 2011). Elles expriment des TLR (toll-like receptors) impliqués dans la réponse immunitaire innée et pourraient par ce biais contribuer à la réponse aux infections en sécrétant un certain nombre de médiateurs de l'inflammation (Berthet et al., 2010; Cognasse et al., 2005). De plus, plusieurs récepteurs à la surface des plaquettes reconnaissent des ligands présents sur les monocytes et les neutrophiles, entraînant la formation d'agrégats leuco-plaquettaires circulants (Seizer et al., 2008; Zago et al., 2008; Projahn and Koenen, 2012). Les plaquettes activées peuvent sécréter des chimiokines qui contribuent au recrutement des monocytes (von Hundelshausen et al., 2001) ou à la différenciation des macrophages (Weber, 2005). L'interaction des plaquettes avec les neutrophiles via PSGL-1, un ligand de P-sélectine, est très importante pour initier la

réponse inflammatoire innée et l'extravasation des neutrophiles (Sreeramkumar et al., 2014). Les interactions des plaquettes avec les cellules endothéliales lors d'une infection conditionnent également la migration des monocytes vers le site d'inflammation (Gawaz et al., 2005). Le CD40 ligand (CD40L) qui est produit par les plaquettes induit une réponse inflammatoire dans l'endothélium (Henn et al., 1998; Hermann et al., 2001). Le CD40L peut en effet pousser les cellules endothéliales à produire des espèces réactives d'oxygène (Urbich et al., 2002), et à exprimer des molécules d'adhésion, des chimiokines (Henn et al., 1998) et du facteur tissulaire (Slupsky et al., 1998). Contrairement au CD40L qui est stocké dans les plaquettes, l'IL-1 β est synthétisée lors de l'activation plaquettaire (Lindemann et al., 2001). Cette production d'IL-1 β est suffisante pour pousser les cellules endothéliales à exprimer les gènes impliqués dans l'adhésion des leucocytes (Denis et al., 2005). L'IL-1 β active les cellules endothéliales, ce qui cause une augmentation de la sécrétion des chimiokines ainsi qu'une augmentation de l'expression des molécules qui provoquent l'adhésion des neutrophiles et des monocytes à l'endothélium (Gawaz et al., 2005).

Ainsi, l'implication des plaquettes dans l'inflammation correspond à un processus dynamique qui met en jeu différents mécanismes. Il est important de noter que ce phénomène est réciproque puisqu'un rôle pléiotropique des leucocytes dans l'hémostase et la thrombose, connu sous le terme d'«immunothrombose», a été décrit (Engelmann and Massberg, 2013).

L'importance des relations intimes entre plaquettes et cellules de l'inflammation est retrouvée dans plusieurs pathologies (Huang and Chang, 2012), notamment les maladies neurodégénératives (Langer et al., 2012), l'athérosclérose (Totani and Evangelista, 2010; Fuentes Q et al., 2013; Li, 2013;), le syndrome coronarien aigu (Davì and Patrono, 2007), l'arthrite rhumatoïde (Boilard et al., 2012) ou encore le lupus (Boilard et al., 2012).

III.3 Plaquettes et cancers

L'association entre le nombre de plaquettes et le potentiel métastatique du cancer a été rapporté pour la première fois au 19^{ème} siècle (Gasic et al., 1968). Les auteurs avaient montré la présence d'une corrélation entre la diminution du nombre de plaquettes et la diminution des métastases (Gasic et al., 1968). Expérimentalement, l'induction d'une thrombocytopénie, par différentes approches, a aussi été associée à une réduction du

nombre de métastases (Karachaliou et al., 2015). A l'inverse une élévation du nombre de plaquettes a été associée à la présence de tumeurs métastatiques (Erpenbeck and Schön, 2010; Karachaliou et al., 2015). Il a été montré que les cellules tumorales circulantes peuvent interagir physiquement avec les plaquettes et les activer ce qui favoriserait la protection des cellules cancéreuses, notamment en les soustrayant à la surveillance immunitaire, et leur extravasation pour coloniser d'autres tissus et former des métastases (Nieswandt et al., 1999). Schumacher *et al.*, ont montré que l'ATP sécrété par les plaquettes activées suite à leur interaction avec les cellules tumorales entraîne l'ouverture de la barrière endothéliale via le récepteur P2Y2, favorisant ainsi la migration des cellules tumorales vers les tissus (Schumacher et al., 2013). Des études génétiques ont également montré que les plaquettes provoquent l'extravasation des cellules cancéreuses de colon et du sein par le biais du TGF β (transforming growth factor β) qu'elles sécrètent et par contact direct avec les cellules tumorales (Labelle et al., 2011). Enfin, le facteur de croissance VEGF (vascular endothelial growth factor), très présent dans les granules alpha et sécrété lors de l'activation plaquettaire, contribue à la néovasculogenèse tumorale en stimulant la migration et la prolifération endothéliale (Barrientos et al., 2008).

La mégacaryopoïèse

I. Hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production des diverses cellules sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques (HSC). L'hématopoïèse est un processus hiérarchique complexe, dans lequel toutes les cellules sanguines sont générées à partir d'un nombre limité de HSC (Jordan and Lemischka, 1990; Osawa et al., 1996). Il s'agit d'un système extrêmement performant et très régulé qui produit par jour chez un adulte en bonne santé environ 10^{11} à 10^{12} nouvelles cellules sanguines. Les HSC donnent naissance aux progéniteurs multipotents qui produiront par la suite les précurseurs lymphoïdes et myéloïdes (Figure 4). Le siège de l'hématopoïèse varie au cours de la vie puisque l'hématopoïèse embryonnaire est localisée dans le sac vitellin puis dans le foie (Baron, 2003) alors que l'hématopoïèse adulte est localisée dans la moelle osseuse. Il est admis que les LT-HSC (long-term HSC) sont les véritables cellules souches hématopoïétiques qui ont des capacités d'auto-renouvellement importantes et qui produisent les ST-HSC (short-term HSC) dont les capacités d'auto-renouvellement sont plus limitées et qui produiront les progéniteurs pluripotents. Ces progéniteurs qui perdent la capacité d'auto-renouvellement s'engageront, sous l'effet de divers facteurs de croissance, vers les précurseurs lymphoïdes et myéloïdes qui *in fine* produiront les cellules sanguines matures. Les précurseurs lymphoïdes produisent les lymphocytes T et B alors que les précurseurs myéloïdes donnent naissance aux précurseurs granulocytes-macrophages qui produiront les granulocytes et les macrophages et aux précurseurs mégacaryocytes-érythrocytes qui donneront naissance aux plaquettes et aux globules rouges. Dans certaines conditions, les précurseurs mégacaryocyte-érythrocyte peuvent directement dériver des HSC sans passer par l'intermédiaire des précurseurs myéloïdes (Forsberg et al., 2006).

L'hématopoïèse est régulée par de nombreux facteurs de croissance solubles ou cytokines (IL3, IL6, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, EPO, TPO, etc) qui vont déterminer l'engagement dans une lignée et la différenciation qui en résulte par succession d'activation et/ou de mise en silence de gènes répondant aux informations reçues par la cellule. Dans ce contexte, un grand nombre de facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation

de l'hématopoïèse et déterminent le devenir d'une cellule dans sa différenciation. Nombre de ces facteurs de transcription sont mutés dans des pathologies hématologiques malignes.

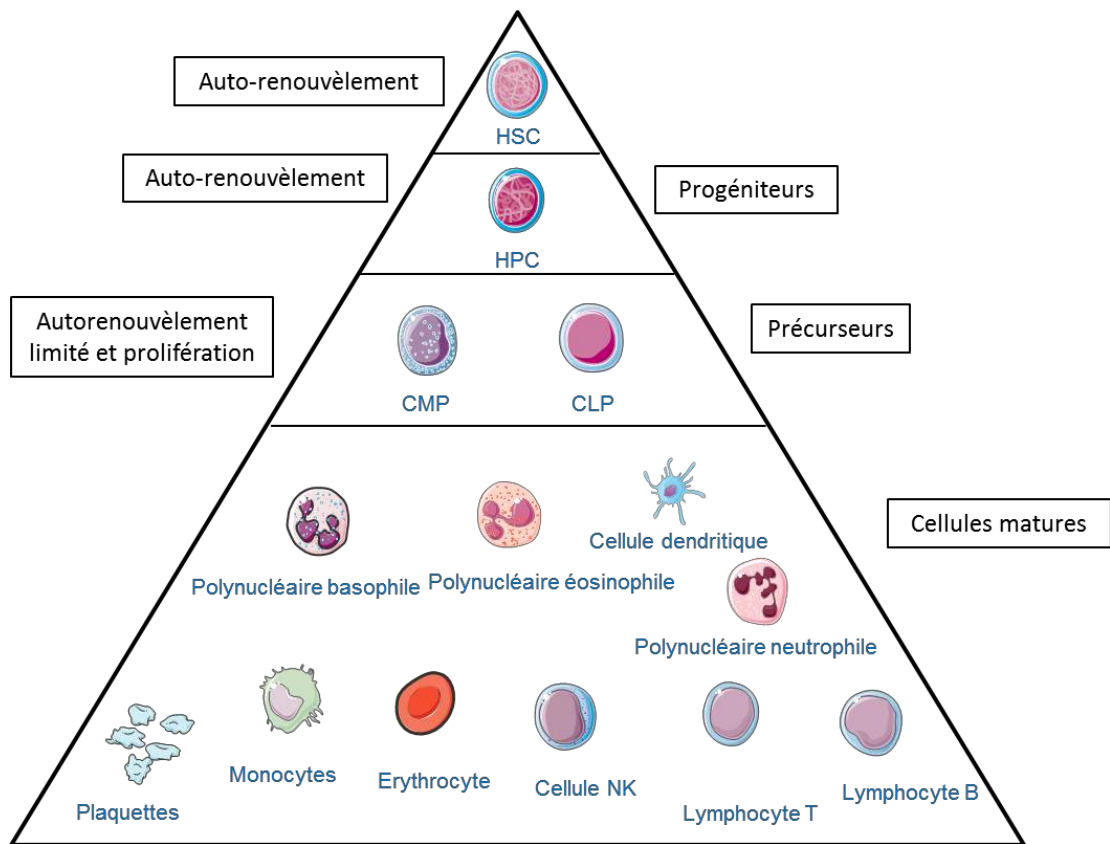


Figure 4 : Représentation schématique simplifiée de l'hématopoïèse. La cellule souche hématopoïétique (HSC : hematopoietic stem cell) multipotente, capable d'auto-renouvellement, se différencie en progéniteurs multipotents possédant un haut potentiel prolifératif (HPC) qui vont générer les précurseurs myéloïde (CMP : common myeloid progenitor) et lymphoïde (CLP : common lymphoid progenitor). Sous l'effet combiné de la niche hématopoïétique et des divers facteurs de croissance ces précurseurs vont se différencier pour produire les diverses cellules sanguines.

Le microenvironnement joue également un rôle critique dans la régulation de l'hématopoïèse. Le maintien du pool de CSH, l'auto-renouvellement et le processus de différenciation dépendent des liens avec le microenvironnement qui lui est dédié. Les LT-HSC, qui sont des cellules quiescentes, se localisent près de l'os à l'interface de la moelle osseuse dans la niche ostéoblastique. Les ST-HSC, qui se différencient en progéniteurs, sont localisées près des cellules endothéliales des sinusoides sanguins médullaires correspondant à la niche périvasculaire (Ho et al., 2015) (Figure 5).

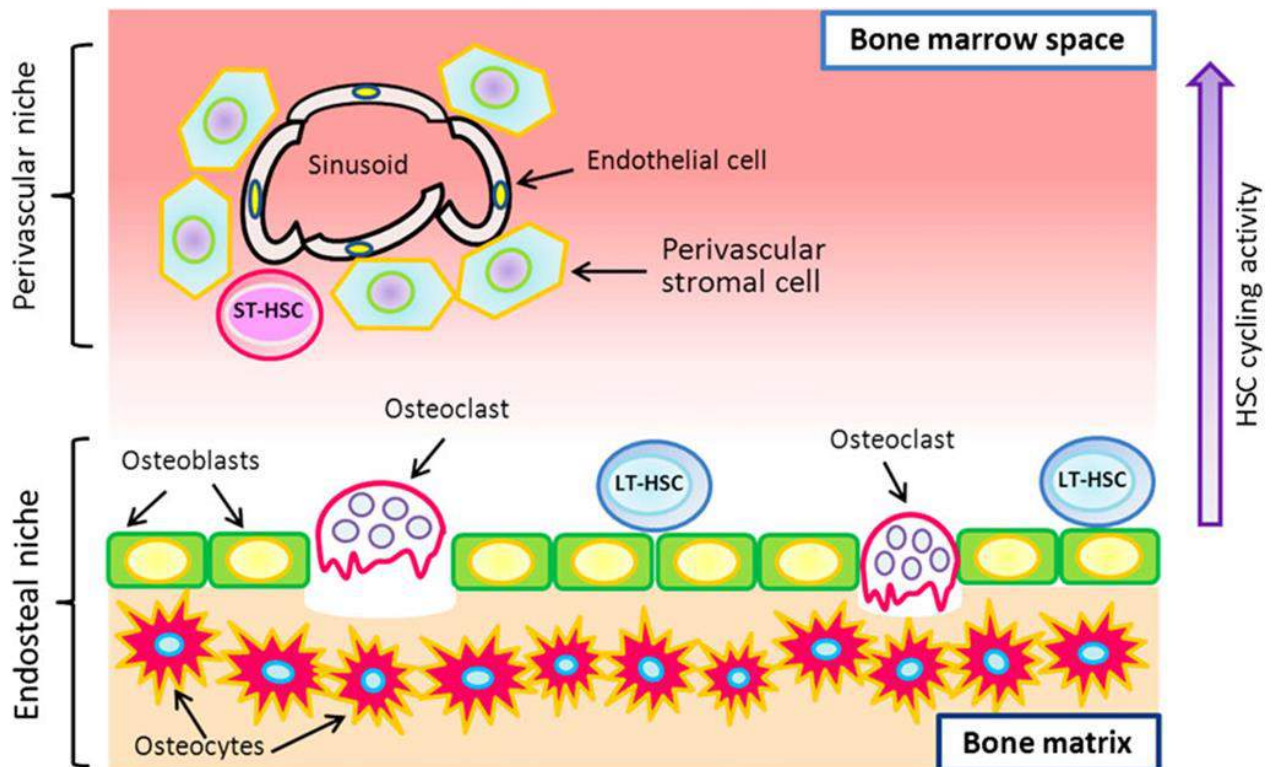


Figure 5 : Représentation schématique des HSC dans la moelle osseuse. Dans la moelle osseuse on distingue deux types de HSC : i) les LT-HSC (long term hematopoietic stem cell) qui sont les cellules qui s’auto-renouvellent lentement et ii) les ST-HSC (short term hematopoietic stem cell), qui s’auto-renouvellent plus rapidement. Les LT-HSC se localisent préférentiellement dans la niche endostéale à l’interface de la moelle osseuse et de l’os tandis que les ST-HSC se rencontrent plus fréquemment dans la niche périvasculaire, près des cellules endothéliales des sinusoides vasculaires. Les ST-HSC vont proliférer et se différencier pour donner les progéniteurs. (D’après Ho et al., 2015).

II. Mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse est un processus de différenciation très régulé qui permet la maturation des progéniteurs mégacaryocytaires en mégacaryocytes (MK) plaquetto-gènes. Ce processus permet la formation et le relargage des plaquettes dans le flux sanguin au niveau des sinusoides médullaires (Battinelli et al., 2007). Durant la maturation, les MK augmentent fortement leur taille, fabriquent des granules spécifiques et développent un système de membranes très invaginé appelé système de démarcation (DMS) qui sert de réservoir membranaire pour la formation des proplaquettes (PPT).

Lors de la maturation des mégacaryocytes se met en place un processus d’endomitose qui conduit à la polyploïdisation des MK (allant de 2N à 64N, voire 128N). Cela est accompagné d’un intense remodelage du cytoplasme pour former le DMS puis les PPT. Ces dernières vont traverser la barrière endothéliale des sinusoides médullaires pour se

retrouver dans la circulation sanguine. Une fois dans la circulation, les PPT vont subir des phénomènes de fissions pour délivrer les plaquettes dans le flux sanguin (Thon and Italiano, 2012) (Figure 6). La mégacaryopoïèse est régulée positivement ou négativement par des cytokines (en première ligne la thrombopoïétine ou TPO) et par une série de facteurs de transcription tels que RUNX (AML1), GATA-1, FOG-1, GF11b, NF-E2, MYB ou FLI-1 qui coordonnent l'expression des gènes inhérents à la différenciation des MK (Chang et al., 2007).

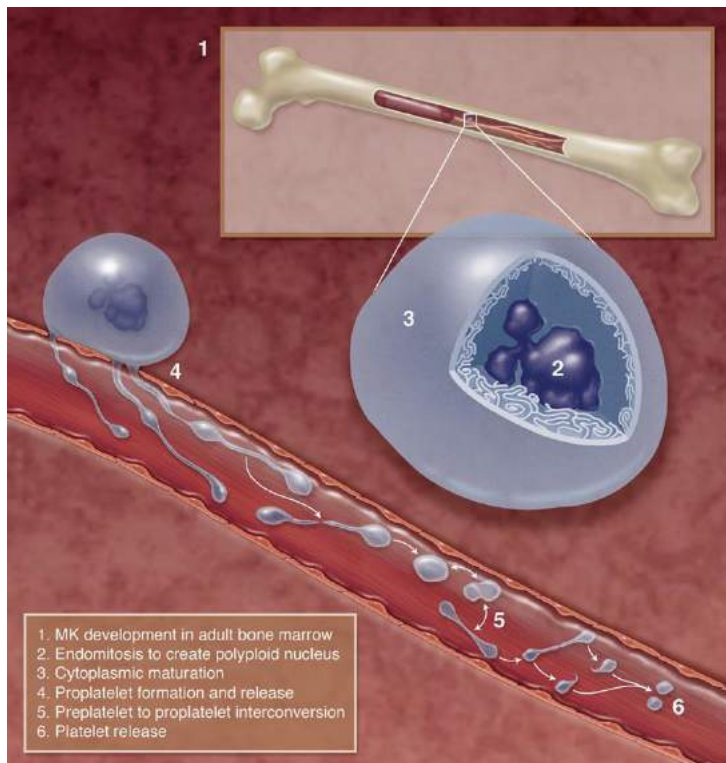


Figure 6 : Illustration des étapes de différenciation d'un MK en plaquette. 1) différenciation des MK dans la moelle osseuse sous l'influence de la TPO. 2) les MK subissent des endomitoses et augmentent ainsi leur contenu d'ADN de 2N jusqu'à 128N. 3) pendant leur maturation, les MK développent des invaginations membranaires qui sont en continu avec la membrane plasmique et qui sont appelés membranes de démarcation ou DMS. Ce réservoir de membrane sert à la formation des proplaquettes. 4) les MK migrent vers la niche vasculaire où ils émettent les proplaquettes dans les sinusoides médullaires. Le noyau du MK est ensuite extrudé et phagocyté. 5) les proplaquettes sont soumises au flux sanguin et produisent des préplaquettes. 6) un événement de fission permet de générer des plaquettes à partir d'une préplaquette. (D'après Machlus and Italiano., 2013).

II.1 Régulation de la mégacaryopoïèse

a) La thrombopoïétine

La thrombopoïétine (TPO) est une glycoprotéine produite de manière constitutive par le foie et le rein qui fonctionne comme une hormone. Sa découverte ainsi que celle de son récepteur c-MPL, spécifique aux MK et plaquettes, a révolutionné la biologie des MK et des plaquettes. Bien que différentes cytokines et le microenvironnement de la moelle osseuse soient impliqués, la TPO est le régulateur majeur du développement et de la

croissance des MK à partir des précurseurs (Bartley et al., 1994; Kaushansky, 1994; Kaushansky et al., 1994; Lok et al., 1994; de Sauvage et al., 1994; Sohma et al., 1994; Wendling et al., 1994). Elle est captée par les plaquettes circulantes et les MK. En conséquence, un nombre accru de plaquettes va abaisser la concentration utile circulante de TPO entraînant une réduction de la mégacaryopoïèse, et inversement. De plus, les plaquettes vieillissantes ayant perdu des résidus sialylés à leur surface sont reconnues par le récepteur Ashwell-Morell du foie entraînant une production locale de TPO qui contribue à renouveler le stock de plaquettes jeunes (Grozovsky et al., 2015).

La découverte du rôle clé de la TPO a facilité le développement du système de culture *in vitro* qui permet de reconstituer la différenciation des MK, leur maturation terminale, la formation des PPT et la formation des plaquettes (Choi et al., 1995; Cramer et al., 1997; Lecine et al., 1998). Des résultats *in vitro* ont montré que la reconnaissance de la TPO par le c-MPL induit la dimérisation du récepteur et l'activation de plusieurs voies de signalisation parmi lesquelles les voies de la PI3K/Akt, des MAPK et de ERK1/ERK2 (Kaushansky, 2005). Malgré l'importance de la TPO pour la différenciation des MK, les souris déficientes en TPO ou en c-MPL parviennent à produire des plaquettes en nombre très réduit (Choi et al., 1995; Ito et al., 1996; Solar et al., 1998). Cela indique que d'autres régulateurs peuvent contribuer à la formation des plaquettes.

Une étude a montré un rôle de la TPO comme régulateur du développement et de la croissance des HSC dans la niche ostéoblastique (Olson et al., 2013). L'expansion des HSC est environ 15 fois plus importante chez les souris sauvages que chez les souris déficientes en TPO. Après irradiation de la moelle osseuse des souris et transplantation de cellules médullaires, il a été démontré que les MK du receveur sont recrutés vers la niche des HSC où ils stimulent leur expansion et facilitent la prise de greffe (Olson et al., 2013). Cette migration des MK vers la niche est dépendante de la signalisation de la TPO *via* son récepteur c-MPL. L'inhibition de la migration des MK dépendante de c-MPL conduit à une diminution importante de la prise de greffe de cellules souches du donneur (Olson et al., 2013).

Ces études montrent donc que la TPO n'est pas seulement importante pour la prolifération et la maturation des MK, mais influence également les HSC et progéniteurs dans la moelle osseuse. Des analogues de la TPO, comme le romiplostim et l'eltrombopag, sont aujourd'hui utilisés en clinique pour stimuler la production de plaquettes lors de

thrombopénies induites par un purpura thrombocytopénique auto-immun idiopathique résistant aux autres traitements.

Le récepteur c-MPL appartient à la famille des récepteurs de cytokine de type I. Ce récepteur ne possède pas d'activité kinase intrinsèque, mais recrute et s'associe directement avec la kinase cytoplasmique JAK2 (Janus Kinase 2) pour activer les voies de signalisation. L'association JAK2/c-MPL stabilise l'expression du récepteur et augmente son trafic vers la membrane (Tong et al., 2006). Des recherches intensives au cours de ces deux dernières décennies ont montré l'activation de plusieurs voies de signalisation suite à une stimulation par la TPO. En raison des similitudes entre c-MPL et EpoR (récepteur à l'érythropoïétine), les premières études se sont focalisées sur la voie JAK/STAT. Les kinases JAK2 et TYK2 ont rapidement été identifiées comme des kinases qui s'activent en se liant directement à c-MPL activé (Bacon et al., 1995; Drachman et al., 1995). Cette voie de signalisation conduit à l'activation de STAT3 et STAT5 (Drachman and Kaushansky, 1997; Socolovsky et al., 1999). La TPO induit également la phosphorylation et la formation du complexe protéique Shc-Gbr2-SOS, ainsi que l'activation des phosphatases SHIP1 et SHPTP-2 et des voies PI3K/AKT (Sattler et al., 1997; Miyakawa et al., 2001) et MAPK (Nagata and Todokoro, 1995; Yamada et al., 1995). La TPO active aussi l'expression de VEGF via la stabilisation de HIF-1 α (Kirito et al., 2005) (Figure 7).

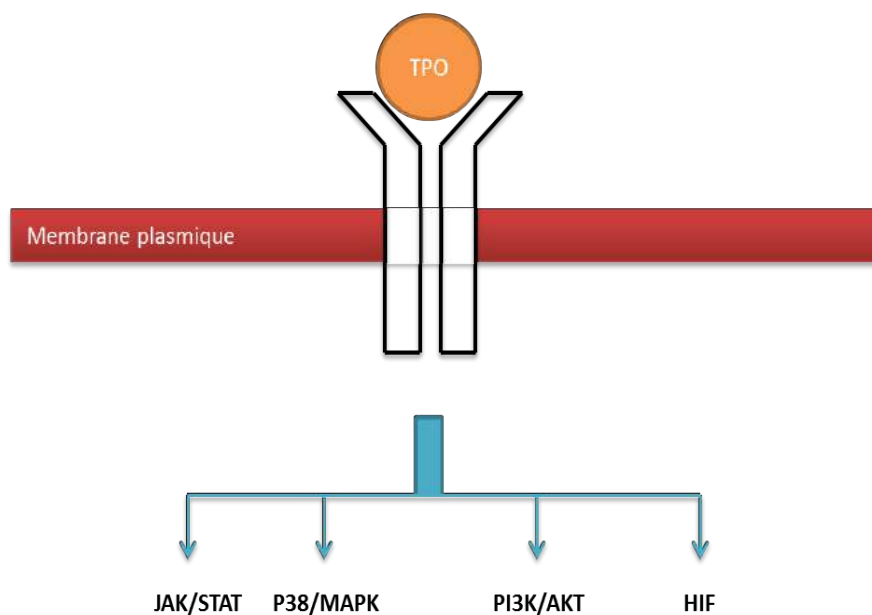


Figure 7 : Représentation schématique des mécanismes moléculaires induits par la TPO. Suite à la fixation du TPO sur son récepteur homodimérique c-MPL, une activation de plusieurs voies de signalisation en aval du récepteur aura lieu.

b) Régulation par d'autres facteurs de croissance

Bien que la TPO soit le régulateur physiologique préférentiel de la mégacaryopoïèse, d'autres facteurs contribuent à la stimulation du développement des MK que ce soit seul ou en combinaison avec la TPO (Kaushansky and Drachman, 2002). Parmi ces facteurs, on trouve le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), l'IL-3, l'IL-6, l'IL-11, le SCF (stem cell factor), le ligand de FLT-3, le FGF (fibroblast growth factor) et l'EPO (érythropoïétine) (Tomer et al., 1987, 1988; Broudy and Kaushansky, 1995; Deutsch et al., 1995; Kaushansky, 1995; Bruno et al., 2003). De plus, certains facteurs sont connus pour inhiber le développement des MK comme le TGF- β 1 (Kuter et al., 1992), le PF4 et l'IL-4 (Han et al., 1991; Zauli and Catani, 1995).

c) Chemokines et interactions cellulaires

La mégacaryopoïèse requiert des cytokines, des chemokines et une interaction cellulaire avec les HSC et la moelle osseuse (Avecilla et al., 2004). Le SDF-1, protéine synthétisée par les cellules stromales de la moelle, est un facteur important pour la régulation de la mégacaryopoïèse. Le SDF-1 et son récepteur CXCR4 permettent la migration des MK de la niche ostéoblastique jusqu'à la niche vasculaire (Niswander et al., 2014). En agissant avec le FGF-4, le SDF-1 contribue à la production de plaquettes chez les souris invalidées pour la TPO ou c-MPL (Avecilla et al., 2004).

d) Les facteurs de transcriptions

Le développement du mégacaryocytes est contrôlé par l'action de différents facteurs de transcription, qui forment des complexes pour réguler l'organisation de la chromatine (Chang et al., 2007). Ceci conduit à l'activation des gènes de la lignée mégacaryocytaire et/ou à la suppression des gènes supportant les autres types cellulaires. Plusieurs gènes spécifiques des MK sont régulés par les facteurs GATA (Globin transcription factor) et FOG (Friend of GATA), l'un des plus importants cofacteurs de GATA-1. GATA-1 régule l'expression de gènes spécifiques des MK tels que *GPIIB*, *PF4*, *GPIb α* , *β -TG*, *GPIX* et *GPV*. GATA-1 peut interagir avec PU.1 et réprime ainsi la différenciation vers la lignée myéloïde dépendante de PU.1. La compétition entre ces deux facteurs jouent un rôle dans l'orientation de la différenciation des progéniteurs myéloïdes communs (Nutt et al., 2005; Chou et al., 2009). FLI-1 coopère avec GATA-1 et FOG pour activer l'expression de

gènes tardifs de la différenciation positive des MK (*GPIX*, *GPIb α* , *PF4*) et réprime l'activité de facteurs érythroïdes (Starck et al., 2003). Des mutations de GATA-1 sur le site d'interaction avec FOG-1 entraînent une dysérythropoïèse liée à l'X associée à une macrothrombocytopénie. Le syndrome de Jacobsen/thrombopénie familiale de Paris-Trousseau avec granules alpha géants est dû à une délétion du bras long du chromosome 11 dont le site de cassure est situé dans l'intervalle 11q23.3-24.2 entraînant une haploinsuffisance en *FLI-1*. Chez la souris l'inactivation de GATA-1 est létale alors que celle de *FLI-1* entraîne une thrombopénie modérée accompagnée de défauts de maturation des MK.

RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) ou *AML1* (acute myeloid leukemia) joue un rôle important dans le développement des MK. La suppression de ce gène provoque une thrombopénie marquée (Ichikawa et al., 2004). Des mutations pertes de fonction de *RUNX1* sont retrouvées dans des thrombopénies familiales avec prédisposition pour développer une leucémie myéloïde aiguë.

Enfin, *NF-E2* (nuclear factor erythroid 2) contrôle les étapes de maturation finale des MK notamment la formation du DMS et des PPT (Lecine and Shivdasani, 1998; Schulze and Shivdasani, 2004). Son inactivation chez la souris provoque une thrombocytopénie profonde.

II.2 Endomitoses

L'une des caractéristiques du MK mature est d'être une grande cellule avec un gros noyau polylobé polyploïde. L'endomitose, processus dépendant de la TPO, conduit le MK à devenir polyploïde suite à des réplifications de l'ADN sans division cellulaire (Machlus et al., 2014). Durant leur cycle cellulaire, les MK passent par un stage de prolifération 2N qui est identique aux autres types de cellules hématopoïétiques. Ensuite, le processus d'endomitose s'installe et l'ADN s'accumule pouvant atteindre 128N dans une même cellule lors de la maturation terminale et de la formation des PPT (Zimmet and Ravid, 2000). Les mécanismes moléculaires qui régulent le processus d'endomitose sont encore incomplètement caractérisés. Brièvement, des études ont montré que la polyploïdie est en relation avec le cycle cellulaire et dépend de la dégradation de la cycline B et de l'activité réduite de la kinase CDK1 (Datta et al., 1996; Zhang et al., 1996). D'autres travaux ont démontré que l'endomitose a lieu à cause d'un défaut dans la cytokinèse où l'anneau d'actomyosine, qui génère la force mécanique nécessaire à la séparation de la cellule, ne

se forme pas correctement (Chang et al., 2007; Geddis et al., 2007; Lordier et al., 2008). En effet, l'anneau contractile contient de la myosine II et de la F-actine générant les forces mécaniques nécessaires à la séparation cellulaire. L'inhibition de RhoA et de la ROCK kinase contribue au défaut de formation de l'anneau contractile (Lordier et al., 2008). De plus, la myosine IIB non musculaire (MYH10) disparaît en cours de différenciation mégacaryocytaire. RUNX1 est un répresseur de MYH10 et en l'absence de MYH10 un taux plus élevé de ploïdie est observé alors que sa surexpression diminue la ploïdie (Lordier et al., 2012). MYH10 joue donc un rôle important dans la commutation mitose/endomitose.

Récemment, l'implication de protéines tyrosine phosphatases Shp1 et Shp2 dans l'endomitose a été démontrée (Mazharian et al., 2013). En créant des MK n'exprimant plus Shp1 et/ou Shp2, les auteurs ont trouvé des défauts d'endomitoses et la ploïdie a rarement atteint un stade supérieur à 2-4N (Mazharian et al., 2013). Les MK déficients en Shp2 présentent une macrothrombocytopenie due à une réduction de l'expression du récepteur à la TPO, MPL, et de la signalisation par les intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Le blocage de la ploïdie dans les MK déficients en Shp1 résulte d'un défaut de sillon de clivage lors de la cytokinèse au moment de la transition 2N/4N. La double invalidation Shp1/2 conduit à un phénotype plus sévère à cause de la perturbation de multiples voies de signalisation. Ces données montrent l'importance de Shp1 et 2 dans la maturation des MK.

La polyploïdie est un moyen pour les MK de produire un grand nombre de plaquettes en augmentant la synthèse protéique et le volume du cytoplasme ainsi que l'efficacité des voies métaboliques produisant l'énergie nécessaire à la production intense de plaquettes fonctionnelles (Machlus et al., 2014).

II.3 Le système de membrane de démarcation (DMS)

La maturation des MK est caractérisée par la formation progressive d'un système de membrane élaboré et qui est en continuité avec la membrane plasmique, ce système est appelé membrane de démarcation ou DMS. Le DMS dérive de la membrane plasmique et reste en contact avec l'environnement extracellulaire, il fonctionne comme un réservoir membranaire pour la formation des PPT (Behnke, 1968, 1969). Des travaux réalisés par Schulze *et al.*, en 2006, ont montré que la force nécessaire pour l'invagination du DMS dépend de l'assemblage des fibres d'actines via la voie WASp/WAVE et implique le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Schulze et al., 2006). Le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ s'accumule dans le DMS par

l'intermédiaire de la PtdIns5P 4-Kinase α , qui produit le PtdIns(4,5)P₂ à partir du PtdIns5P. La génération de souris invalidées pour cette kinase conduit à une désorganisation des membranes internes dans les MK (Schulze et al., 2006). Une autre étude a montré la contribution des forces du cytosquelette dans le développement du DMS en se focalisant sur une protéine contenant un domaine F-BAR, CIP4 (Cdc42 interacting protein 4) (Chen et al., 2013a). CIP4 fait un pont entre la membrane et le cytosquelette et favorise la réorganisation du cytosquelette d'actine qui contribue à la formation du DMS (Chen et al., 2013a; Machlus et al., 2014). La réorganisation du cytosquelette se fait grâce à l'interaction de CIP4 avec le domaine SH3 (SRC Homology 3) de WASp. En effet, les souris KO CIP4 ou WASp ont des phénotypes plaquettaires assez similaires. Elles présentent une thrombopénie ainsi que des anomalies de tension corticale, avec une dynamique de l'actine altérée. La perte de CIP4 entraîne la formation de plaquettes avec une rigidité membranaire altérée, un DMS mal formé et une réduction de la formation de PPT. La perte de WASp conduit à la génération de plaquettes de petites tailles qui semblent être produites en partie dans la moelle osseuse (Haddad et al., 1999; Sabri et al., 2006; Chen et al., 2013b). Ces données suggèrent donc que CIP4 facilite le remodelage du cytosquelette et des membranes participant à la formation du DMS et illustrent l'importance de la dynamique des membranes et du cytosquelette du MK dans la biogenèse des plaquettes. Notre équipe a récemment montré que le système des filaments d'actine et la GTPase Cdc42 jouent un rôle important dans la formation du DMS (Antkowiak et al., 2016).

Une étude récente a clairement démontré que la biogenèse du DMS provient de la membrane plasmique (Eckly et al., 2014). En effet, en utilisant la microscopie confocale et électronique en 3D sur des MK, Eckly *et al.*, ont mis à jour les différentes étapes de formation du DMS. En utilisant comme marqueur membranaire la protéine GPIIb β (sous-unité du récepteur au vWF), ces auteurs ont observé un pré-DMS dans les MK immatures. Cette étude suggère qu'une partie des membranes du DMS est formée à partir du Golgi et du réticulum endoplasmique (Eckly et al., 2014). En résumé, il est donc proposé que la biogenèse du DMS débute par un point focal de la membrane plasmique à la périphérie cellulaire qui s'invagine pour former le pré-DMS qui se développera en DMS grâce à la contribution des membranes apportées par le Golgi et le réticulum endoplasmique.

II.4 Formation des proplaquettes

Dans le modèle de fragmentation cytoplasmique des MK proposé il y a plusieurs années, le système extensif de membranes internes du cytoplasme des MK, correspondant au DMS, subirait des modifications pour former des plaquettes préemballées qui seraient libérées lors de la fragmentation du cytoplasme (Yamada, 1957). Si ce modèle peut exister dans certaines conditions (Nishimura et al., 2015), l'évolution des technologies de microscopie a permis de mettre en évidence un second modèle où les plaquettes sont formées dans les MK matures, à partir des PPT, longs prolongements vers les vaisseaux sinusoïdes de la moelle osseuse. *In vitro*, la formation des PPT a été visualisée sur des MK humains (Cramer et al., 1997), de cochons d'inde (Leven and Yee, 1987; Tablin et al., 1990) et de souris (Radley and Haller, 1983; Radley et al., 1987, 1991; An et al., 1994). Ces extensions sont générées grâce aux microtubules qui partent du corps cellulaire vers les bouts des extensions des PPT puis font un demi-tour et réintègre le corps cellulaire (Tablin et al., 1990; Italiano et al., 1999). La formation des PPT débiterait de façon polarisée où un pseudopode se forme pour produire un tubule de diamètre compris entre 2 et 4 μm (Italiano et al., 1999). Ces PPT fonctionnent comme réseau de production des plaquettes en formant des bourgeons alignés en tandem sur les prolongements qui correspondent au diamètre moyen d'une plaquette sanguine. Le noyau multilobé reste dans le corps cellulaire pendant que le reste du MK se transforme en PPT. Une fois que le MK s'est transformé en PPT, le noyau est extrudé et phagocyté par les macrophages (Gordge, 2005). La formation des PPT a surtout été étudiée *in vitro* dans des MK de souris qui dérivent de cellules souches de foies fœtaux (Italiano et al., 1999; Patel et al., 2005a, 2005b; Patel-Hett et al., 2008, 2011; Thon et al., 2010, 2012a, 2012b) ou de moelle osseuse (Strassel et al., 2012). Cependant, la formation des PPT *in vivo* a été rapportée dans plusieurs études montrant des images et des vidéos de PPT étendues dans les vaisseaux sinusoïdes de la moelle osseuse (Becker and De Bruyn, 1976; Behnke, 1969; Junt et al., 2007). Sous l'effet du flux sanguin il est proposé que les PPT se convertissent en plaquettes et/ou en pré-plaquettes qui ont une forme d'haltère (barbell-shaped proplatelets) et qui poursuivront leur division en deux plaquettes dans la circulation (Machlus and Italiano, 2013).

Les granules des mégacaryocytes et des plaquettes

I. Généralité

Le bon fonctionnement des plaquettes est largement conditionné par des facteurs solubles qui sont sécrétés par les granules alpha et denses ainsi que par les lysosomes (King and Reed, 2002). En effet, les plaquettes stockent de petites molécules dans leurs granules denses et plusieurs centaines de protéines différentes dans leurs granules alpha. Les granules sont générés dans les MK par des mécanismes encore assez mal connus. Il semble qu'ils soient formés à partir de bourgeonnement de vésicules intracellulaires contenant des protéines cargo venant du réseau trans-Golgien et des endosomes (Blair and Flaumenhaft, 2009) et qui sont délivrés directement aux corps multi-vésiculaires (MVB) où un tri protéique est réalisé (Heijnen et al., 1998; Youssefian and Cramer, 2000). Les MK vont ensuite "charger" les plaquettes avec le nombre approprié de granules qui seront essentiels pour leur fonction. Dans le modèle de formation des plaquettes par fragmentation cytoplasmique les organelles et les granules sont emballés dans le corps cellulaire du MK (Kosaki, 2005). En revanche, dans le modèle de formation de plaquettes à partir des PPT les composants intracellulaires des plaquettes sont adressés du corps cellulaire des MK vers les PPT puis les plaquettes. Cette dynamique spatiotemporelle est sous le contrôle de protéines qui transportent les organelles tout au long du cytosquelette d'actine ou de tubuline vers leur destination finale (Vale, 2003; Mallik and Gross, 2004). Ce transport a été étudié notamment par l'équipe d'Italiano par microscopie en temps réel (Richardson et al., 2005). La caractérisation de la dynamique des organelles dans les PPT a révélé que les granules sont individuellement transportés le long des PPT sur les microtubules à une vitesse de 0.1 à 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ et se déplacent de façon bidirectionnelle jusqu'à ce qu'ils soient capturés à l'extrémité de la PPT (Richardson et al., 2005).

II. Les granules alpha

Dans les mégacaryocytes matures les granules alpha sont majoritaires et en moyenne dix fois plus abondants que les granules denses. C'est également le cas dans les plaquettes où ils occupent environ 10% du volume plaquettaire et sont présents à raison de 50 à 80 granules alpha par plaquette. Ils sont sphériques ou ovales de 200 à 500 nm de diamètre (Frojmovic and Milton, 1982). Ces granules contiennent une grande variété de protéines adhésives qui sont importantes pour l'hémostase primaire, comme le facteur de von Willebrand (vWF), le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine et la thrombospondine (Heijnen and van der Sluijs, 2015). Ces protéines sont importantes pour les propriétés adhésives des plaquettes et la formation d'un thrombus stable. Les granules alpha contiennent aussi des molécules qui ont une fonction dans la coagulation (facteurs V, XI, XIII) et également dans la cicatrisation, l'inflammation et l'angiogenèse (Heijnen and van der Sluijs, 2015). Parmi ces molécules, on retrouve le PF4 (platelet factor 4), l'IL-8 (interleukine 8), le PDGF (platelet derived growth factor), le TGF- β (transforming growth factor- β) et le VEGF (vascular endothelial growth factor) (Heijnen and van der Sluijs, 2015). Le PF4, la β -thromboglobuline (ou CXCL7) et Rantes (ou CCL5) sont les chimiokines les plus abondantes dans les granules alpha. Le PF4, CXCL7 et l'IL-8 sécrétés par les plaquettes activées modulent l'inflammation en recrutant les neutrophiles (Labelle et al., 2014).

Certains constituants des granules alpha plaquettaires, comme le fibrinogène ou l'albumine, sont internalisés alors que d'autres sont synthétisés dans le MK puis chargés dans les granules (Heijnen and van der Sluijs, 2015). La théorie selon laquelle les granules alpha représentent une population homogène d'organelles a été contestée par plusieurs groupes. L'équipe d'Italiano a notamment montré que des protéines pro et anti-angiogéniques sont distribuées différemment dans les granules alpha et sont sécrétées de façon différente et indépendante (Italiano et al., 2008). De plus, une tomographie en microscopie électronique permettant de visualiser les granules en 3D, a montré la présence de différentes classes de granules alpha, les sphériques, les multi-vésiculaires et les tubulaires (van Nispen tot Pannerden et al., 2010).

II.1 Biogenèse des granules alpha

La genèse des granules alpha débute dans les MK mais leur dynamique se poursuit dans les plaquettes circulantes. Ces granules dérivent en partie du bourgeonnement de vésicules

contenant des protéines cargo en provenance du TGN (Hegyi et al., 1990) et pour une autre partie de la voie d'endocytose (King and Reed, 2002). Plusieurs protéines granulaires synthétisées dans le réticulum endoplasmique des MK sont exportées vers le Golgi pour subir une maturation et sont ensuite triées au niveau du TGN (Cramer et al., 1989). D'autres protéines granulaires utilisent l'endocytose. C'est le cas notamment du fibrinogène qui est incorporé dans les granules alpha *via* son récepteur de surface, l'intégrine α IIb β 3 (Blair and Flaumenhaft, 2009). Les vésicules qui bourgeonnent du TGN ou de la membrane plasmique sont recouvertes de clathrine et sont dirigées vers les corps multivésiculaires (MVB) qui correspondraient à un stade intermédiaire dans la production des granules (Heijnen et al., 1998) (Figure 8). Des études ont montré que le transport des protéines endocytées à la membrane plasmique se poursuit vers les MVB immatures (nommé MVB I) puis vers les MVB matures (ou MVB II) et enfin vers les granules alpha (Heijnen et al., 1998). Les MVB contiendraient également des vésicules de 30 à 70 nm nommées exosomes (Heijnen et al., 1998). Certains exosomes persistent dans les granules alpha matures et sont sécrétés après activation plaquettaire (Heijnen et al., 1999). L'ensemble de ces travaux suggère fortement que les MVB représentent une étape importante dans le développement et la maturation des granules alpha. Cependant, la maturation de ces granules se poursuit dans les plaquettes circulantes où l'endocytose, depuis la membrane plasmique, continue à les alimenter (Zucker-Franklin, 1981; Behnke, 1992). Une étude a montré que le taux des protéines endocytées dans les granules alpha augmente quand la plaquette vieillit (Heilmann et al., 1994). Ces observations suggèrent que le trafic des protéines vers les granules alpha se fait d'une manière constitutive durant la vie de la plaquette.

Les diverses étapes de biogenèse des granules alpha font intervenir de nombreuses protéines impliquées dans le trafic. Les plus connues sont la protéine à domaine BEACH, NBEAL2 (Neurobeachin-Like 2) et les protéines de trafic vésiculaire VPS33B et VPS16B. Ces dernières interviennent dans la biogenèse de la membrane des granules alpha (Lo et al., 2005; Urban et al., 2012), tandis que NBEAL2 serait plutôt impliquée dans le contrôle du contenu granulaire (Gunay-Aygun et al., 2011). L'identification du rôle de ces protéines a été possible grâce à l'étude des anomalies moléculaires responsables de maladies rares affectant les granules plaquettaires (Gissen et al., 2004; Lo et al., 2005; Albers et al., 2011; Gunay-Aygun et al., 2011; Kahr et al., 2011; Urban et al., 2012; Bottega et al., 2013).

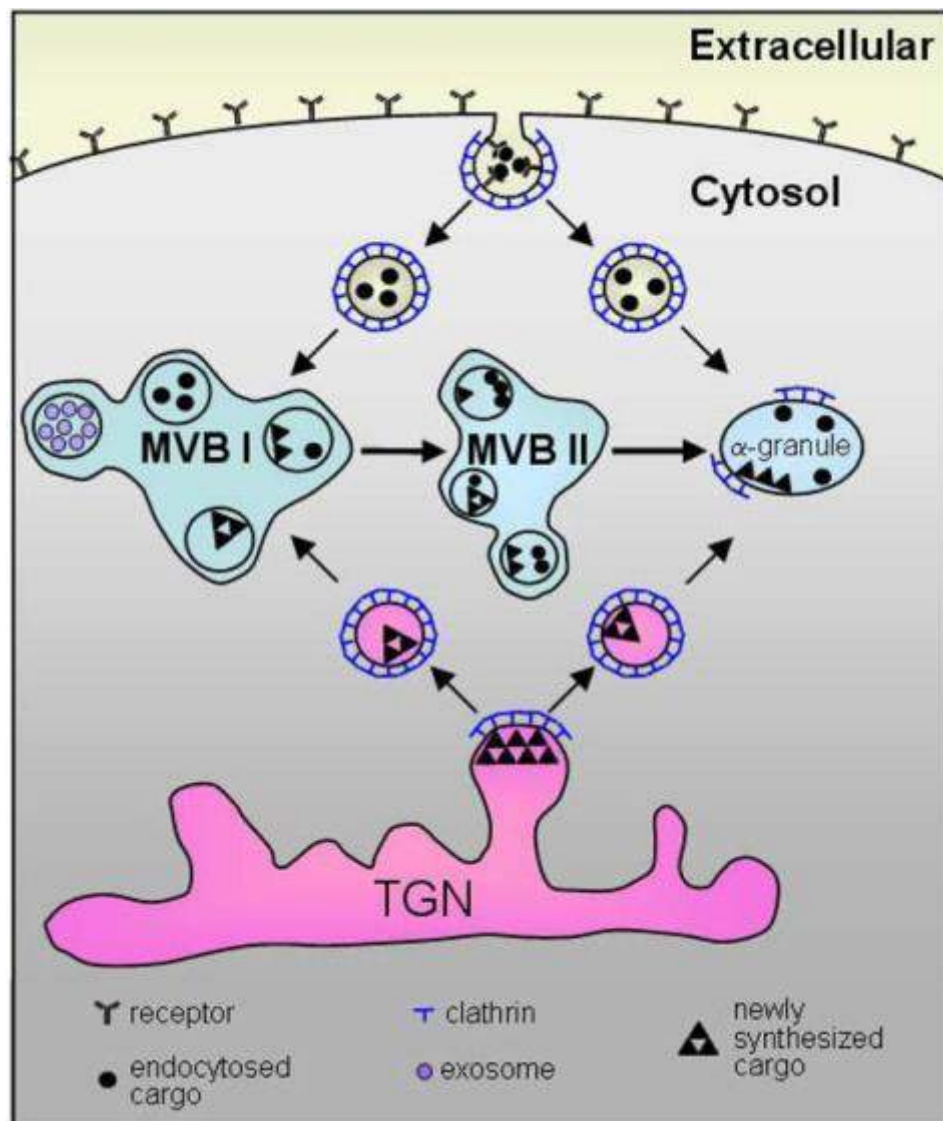


Figure 8 : Modèle proposé montrant la formation des granules alpha dans les MK. Les granules alpha dérivent d'un bourgeonnement du TGN et de l'endocytose à partir de la membrane plasmique. Les deux processus sont dépendants de la clathrine. Les vésicules peuvent être délivrées aux MVB pour être triées. Les MVB peuvent maturer pour produire les granules alpha. Il est aussi possible que les vésicules soient délivrées directement vers les granules alpha. (D'après Blair and Flaumenhaft; 2009)

II.2 Défauts de granules alpha

Dans la mesure où les granules alpha jouent un rôle majeur dans l'hémostase, la cicatrisation, l'inflammation et l'immunité, des granules défectueux peuvent conduire à des pathologies chez l'homme. Les deux syndromes, les mieux documentés, liés à un défaut des granules alpha sont le syndrome des plaquettes grises (GPS) et l'ARC syndrome (Arthrogryposis, renal dysfunction and cholestasis). Deux autres syndromes extrêmement rares sont liés à des défauts au niveau des granules alpha, il s'agit du

syndrome de Quebec et du syndrome de Paris-Trousseau (Breton-Gorius et al., 1995; Veljkovic et al., 2009).

a) Le syndrome des plaquettes grise (GPS)

Le GPS est une maladie génétique héréditaire rare (environ 30 cas documentés en France) touchant les granules alpha et qui se caractérise par un syndrome hémorragique (saignement des muqueuses avec ecchymoses faciales, épistaxis, règles abondantes, saignements pendant les actes chirurgicaux), une macrothrombocytopénie et une évolution vers une myélofibrose (Albers et al., 2011; Rosa, 2013; Nurden and Nurden, 2015). Les examens biologiques montrent des plaquettes qui apparaissent pâles au frottis (Figure 9) sans anomalie des autres lignées myéloïdes. L'agrégation plaquettaire induite par la thrombine et le collagène est diminuée et un déficit de mobilisation de calcium a également été observé (Rosa, 2013). Le diagnostic repose sur la microscopie électronique qui montre des plaquettes avec des structures membranaires vides de matériel (ou vacuoles) et l'absence de granules alpha. Ces vacuoles possèdent le marqueur de membrane alpha-granulaire P-sélectine (CD62p) suggérant que ces vacuoles sont en fait équivalentes à des granules alpha vides (Rosa et al., 1987). En effet, chez les patients atteints de GPS, la quantité de protéines alpha-granulaires synthétisées *de novo* par le MK est fortement réduite, par contre les constituants endocytés sont moins affectés (Weiss et al., 1979; Breton-Gorius et al., 1981; Gunay-Aygun et al., 2011). Ces observations suggèrent que les MK de patients atteints de GPS ne parviennent pas à charger les protéines sécrétoires synthétisées dans les granules alpha (Gunay-Aygun et al., 2011).

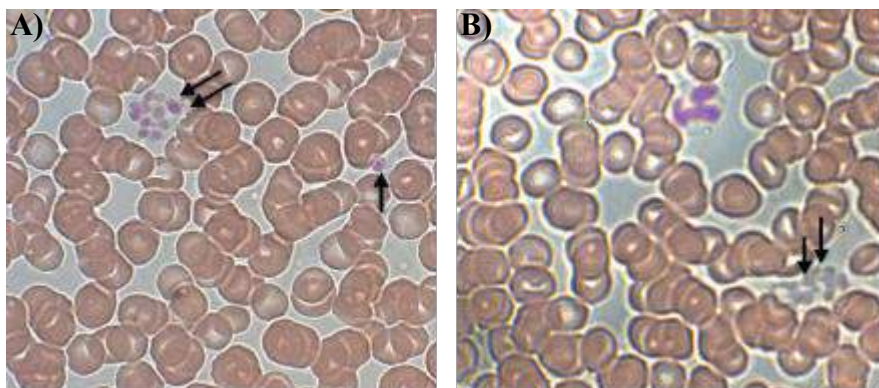


Figure 9 : Images de plaquettes témoin et de GPS. A) Frottis de sang total témoin : un amas de plaquettes normales est indiqué par les flèches. B) Frottis de sang total d'un patient atteint de GPS : un amas de plaquettes de très faible coloration (apparaissant grises) est indiqué par les flèches. (D'après Rosa, 2013).

Pendant longtemps l'origine du syndrome est restée inconnue. Néanmoins, une analyse classique sur génome entier (genome wide association study) sur quatorze familles a identifié une anomalie sur le chromosome 3p21 (Gunay-Aygun et al., 2010). En 2011, trois études indépendantes ont appliqué les technologies modernes de séquençage à des patients GPS et ont pu identifier des mutations dans le gène *NBEAL2* sur le chromosome 3p21 (Albers et al., 2011; Gunay-Aygun et al., 2011; Kahr et al., 2011). La protéine NBEAL2 est un membre de la famille neurobeachin-like qui possède un domaine BEACH commun à de nombreuses protéines de trafic vésiculaire (Wang et al., 2002). Dans NBEAL2, le domaine BEACH est associé à un domaine PH (pleckstrin homology) présent dans de nombreuses protéines, notamment de signalisation, et qui est impliqué dans le ciblage membranaire par interaction avec les phosphoinositides (Jogl et al., 2002). Des études chez des souris KO pour NBEAL2 ont confirmé le phénotype des patients GPS (Deppermann et al., 2013; Kahr et al., 2013). Dans ce modèle la maturation des MK est diminuée, peu de granules alpha y sont visualisés suggérant un défaut de leur formation. Cependant, d'autres auteurs suggèrent que l'absence de granules alpha dans les plaquettes serait dû à leur perte lors des étapes terminales de la différenciation des MK (Guerrero et al., 2014). NBEAL2 serait impliquée dans la maintenance des granules alpha à des stades tardifs de leur biogenèse.

b) L'ARC syndrome

L'ARC syndrome est une maladie autosomale récessive très rare et très grave, caractérisée par des défauts de développement et de fonctionnement de plusieurs organes (Bem et al., 2015; Taha et al., 2007). La majorité des patients atteint du syndrome ARC décèdent dans la première année de vie à la suite de complications métaboliques ou de saignements (Gissen et al., 2006). Les caractéristiques du syndrome ARC comprennent un défaut de granules alpha, une arthrogrypose, une acidose tubulaire rénale, et un ictère néonatal cholestatique (Gissen et al., 2006; Taha et al., 2007). Le locus de cette maladie se trouve sur le chromosome 5q26.1 (Gissen et al., 2004). Le syndrome ARC est causé par une mutation du gène *VPS33B* (vacuolar protein sorting-associated protein 33B) qui code pour une protéine impliquée dans le trafic vésiculaire (Gissen et al., 2004). VPS33B appartient à la famille des protéines Sec1/Munc18, qui sont connues pour leur interaction avec les récepteurs SNARE (soluble NSF attachment protein). Les protéines SNARE sont impliquées dans l'exocytose vésiculaire, la transmission synaptique et la sécrétion en

facilitant la fusion des vésicules (Peterson and Emr, 2001). La mutation du gène *VPS33B* empêche la liaison de la protéine mutante avec la protéine SNARE conduisant à une accumulation de protéines plasmiques dans les cellules. Cependant, seulement 75% des patient ARC possèdent des mutations sur le gène *VPS33B* (Gissen et al., 2006; Cullinane et al., 2009), ce qui suggère la présence d'autres gènes impliqués dans cette maladie, comme le gène *VPS16B* (ou *VIPAR*) dont le produit forme un complexe avec *VPS33B* (Figure 10). Urban *et al.* ont montré que le complexe *VPS33B/VPS16B* régule le trafic du TGN dans des cellules mégacaryocytaires Dami et est important pour la biogenèse des granules alpha (Urban et al., 2012).

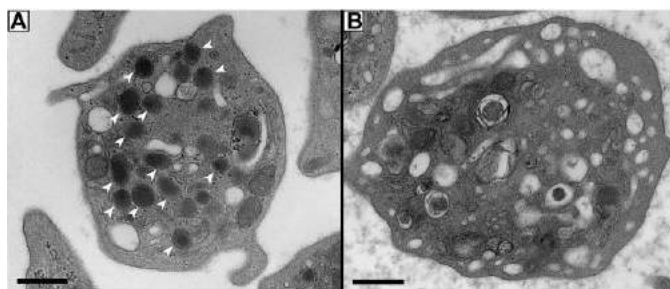


Figure 10 : Microscopie électronique représentant des plaquettes d'un donneur sains et d'un patient ARC (*VPS16B* null). A) Les plaquettes contrôles contiennent plusieurs granules alpha (flèches blanches) qui sont absents dans les plaquettes du patient *VPS16B*null (B). (D'après Urban et al., 2012).

Des plaquettes déficientes en granules alpha ont été observées pour la première fois chez des patients ARC en 1990 (Deal et al., 1990). Ces plaquettes présentent des taux normaux d' α IIb β 3 et de GPIb à leur surface mais elles possèdent très peu de granules alpha et un nombre élevé de granules denses (Urban et al., 2012). *In vitro*, l'agrégation des plaquettes en réponse aux agonistes physiologiques est peu perturbée mais une diminution de l'agrégation en réponse à l'ADP a été observée (Urban et al., 2012). D'autres études chez des patients mutés pour *VPS33B* ont confirmé l'absence de granules alpha dans les plaquettes ainsi qu'une déficience dans la biogenèse de ces granules (Lo et al., 2005; Gissen et al., 2006; Kim et al., 2010; Urban et al., 2012). Il semble que ces MK ne soient pas capables de capturer et stocker les protéines dans les compartiments alpha-granulaires (Harrison and Cramer, 1993; Urban et al., 2012). L'expression de *VPS33B* est décrite dans les mégacaryocytes mais pas dans les plaquettes suggérant un rôle dans la biogenèse des granules et non pas dans les fonctions de maintenance et de sécrétion des plaquettes (Urban et al., 2012).

Récemment, des souris déficientes en *VPS33B* ont été générées (Bem et al., 2015). Comme avec les patients ARC, ces souris présentent des plaquettes avec un nombre très réduit de granules alpha. Pour la première fois, les auteurs ont démontré un contenu anormal de protéines dans les MVB des MK, en particulier dans les MVBII dont la

maturation semble anormale, conduisant vraisemblablement à une déficience dans la production des granules alpha chez les souris déficientes en VPS33B. Ceci suggère que VPS33B régule le tri des protéines vers les granules alpha dans le MK. Comme chez des patients ARC, les plaquettes des souris déficientes en VPS33B contiennent un taux normal de glycoprotéines de surfaces et une agrégation peu perturbée. Ces souris ne présentent pas d'hémorragies spontanées comme les patients ARC mais le temps de saignement après blessure est élevé comparé aux souris contrôles. Le fait que la maturation des MK et la formation des PPT soient normales chez les souris déficientes en VPS33B prouve que VPS33B n'est pas impliqué dans le processus d'endomitose, la formation du DMS et les étapes terminales de la production plaquettaire. Cette étude, ainsi que les études précédentes, montrent que les mutations de VPS33B conduisent à des défauts de biogenèse des granules alpha chez l'homme comme chez la souris (Lo et al., 2005; Urban et al., 2012; Bem et al., 2015).

III. Les granules denses

Les granules denses (ou granules δ) sont un sous type de LRO (lysosome related organelle), qui sont trouvés exclusivement dans les plaquettes (Huizing et al., 2008). Ces granules sont moins nombreux (3 à 8 par plaquette) et plus petits (100 à 300 nm de diamètre) que les granules alpha (Masliah-Planchon et al., 2013). Ils contiennent des concentrations élevées de cations, polyphosphates, ADP (0,4 M), ATP (0,6 M) et sérotonine (65 mM) (Carty et al., 1981; Holmsen and Weiss, 1979; Ambrosio et al., 2015). La forte concentration en calcium (2 M) et polyphosphates dans ces granules leur donne une apparence opaque en microscopie électronique (McNicol and Israels, 1999). Leurs membranes contiennent les marqueurs de lysosomes LAMP2 et CD63 mais pas LAMP1 (McNicol and Israels, 1999; Gunay-Aygun et al., 2004).

Les granules denses jouent un rôle important dans les processus d'hémostase et un défaut de biogenèse de ces granules conduit à des syndromes hémorragiques (McNicol and Israels, 1999; Huizing et al., 2008; Graham et al., 2009). Malgré leur importance dans l'hémostase et la thrombose, la biogenèse des granules denses reste encore peu comprise.

III.1 Biogenèse des granules denses

Comme les granules alpha, les granules denses sont synthétisés dans les MK où ils se forment au niveau des endosomes tardifs et des MVB (Youssefian and Cramer, 2000; Ambrosio et al., 2012; Meng et al., 2012). La biogenèse des granules denses semble mettre en jeu de nombreuses protéines parmi lesquelles Rab38, AP3 (adaptor protein complex 3), LYST (lysosomal trafficking regulator), BLOC (biogenesis of lysosome-related organelle complexes) et le complexe VPS33A/VPS16A (Suzuki et al., 2003; Huizing et al., 2008; Ambrosio et al., 2012). La membrane limitante des granules denses semble partager des protéines avec les organelles du système endolysosomal mais possède également des protéines spécifiques (Ambrosio et al., 2012). Plusieurs voies de biogenèse des granules denses sont décrites. En 2000, Youssefian et Cramer ont montré pour la première fois que les granules denses prennent origine dans les MVB (Youssefian and Cramer, 2000). En effet, grâce à un marquage de la granulophysine, cette équipe a montré que les granules denses sont formés à un stade précoce de la maturation des MK et se trouvent avec les granules alpha dans les MVB (Youssefian and Cramer, 2000).

Une autre étude a montré que les granules denses pouvaient être générés directement à partir des endosomes précoces (Huizing et al., 2008; Meng et al., 2012) (Figure 11).

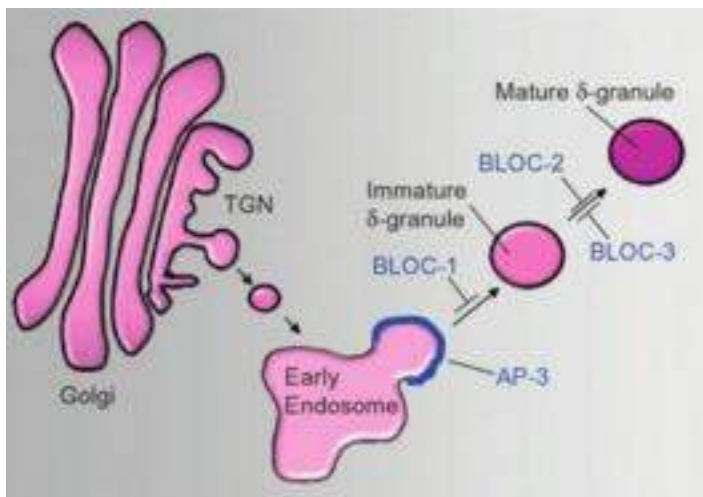


Figure 11 : Modèle de formation des granules denses dans les MK. Les granules denses sont des LRO qui dérivent des endosomes précoces. AP-3 aide à la formation des vésicules qui seront ensuite triées grâce au complexe BLOC1, suivi par BLOC2 et BLOC3. La maturation du granule permet ainsi un stockage adéquat de son contenu. (D'après Flaumenhaft, 2013).

Les protéines BLOC sont un groupe de protéines qui contrôlent la formation et le trafic des compartiments endosomaux vers les lysosomes (Falcón-Pérez et al., 2002; Di Pietro et al., 2004). Plusieurs protéines composant les complexes BLOC-1, 2 et 3 sont retrouvées mutées entre autres dans des pathologies liées à une déficience en granules denses et à des

défauts de pigmentation dus à des dysfonctions de mélanosomes qui font partie des LRO. Au niveau des MK, BLOC-1 est constitué d'au moins huit protéines et semble impliqué dans la sortie des protéines cargo des endosomes précoces vers les granules denses immatures (Setty et al., 2007). BLOC-2 est formé de 3 protéines et joue un rôle dans la maturation des granules denses immatures. Enfin, BLOC-3, est impliqué dans le recrutement de Rab38 et Rab32 pour la maturation des granules denses (Ambrosio et al., 2012; Gerondopoulos et al., 2012) (Figure 12).

D'autre part, un transporteur de sucre nucléotidique, SLC35D3, est impliqué dans la biogenèse des granules denses (Meng et al., 2012). Les souris *slc35d3^{ros/ros}*, ne possédant pas cette protéine, ont une déficience en granules denses, suggérant fortement son implication dans la biogenèse de ces granules. SLC35D3 se localise largement dans la membrane des endosomes précoces et requiert AP3 et BLOC1 pour fonctionner. Ceci suggère que cette protéine régule la biogenèse des granules denses à partir des endosomes précoces et qu'une partie des granules denses dérive directement de ces endosomes sans passer par le stade MVB (Meng et al., 2012).

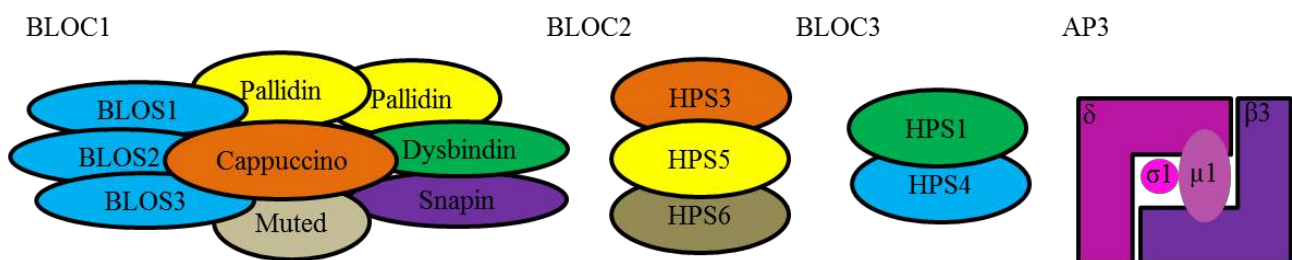


Figure 12 : Les complexes impliqués dans la formation des granules denses. Les protéines BLOC ont un rôle clé dans la formation des granules denses. BLOC1 contient 8 protéines. BLOC2 et BLOC3 sont composés de sous-unités de HPS. AP3 contient 4 sous unités : δ , β_3 , μ_1 et σ_1 .

III.2 Défauts des granules denses

Les défauts de granules denses peuvent être quantitatifs (diminution de leur nombre) ou qualitatifs (incorrectement remplis ou non fonctionnels) et causer un syndrome hémorragique généralement modéré mais d'intensité variable (McNicol and Israels, 1999; Gunay-Aygun et al., 2004; Masliah-Planchon et al., 2013). Les défauts des granules denses correspondent à des maladies congénitales appelées syndrome du pool vide pouvant être associé à d'autres pathologies héréditaires comme le syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS) ou le syndrome de Chediak-Higashi (CHS). Des défauts de

granules denses peuvent aussi apparaître suite à des hémopathies malignes. La diminution de la sécrétion des granules denses conduit à des défauts dans la réponse hémostatique. L'agrégation plaquettaire *in vitro* est réduite en réponse à la majorité des agonistes et la seconde vague d'agrégation en réponse à l'ADP et l'adrénaline est absente. La mesure de la sécrétion d'ATP par luminométrie et de sérotonine dans le lysat plaquettaire ainsi que la quantification de CD63 par cytométrie de flux complètent le diagnostic. On considère que le nombre de patients ayant des défauts de granules denses pourrait être sous-estimé, notamment chez les patients atteints de syndromes hémorragiques modérés (Nieuwenhuis et al., 1987).

a) Le syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS)

Le HPS est un syndrome de transmission autosomique récessif qui englobe un groupe génétiquement hétérogène de maladies, caractérisées par une diathèse hémorragique, un albinisme oculo-cutané qui est parfois associé à des complications graves, telles qu'une immunodéficience, une colite granulomateuse et une fibrose pulmonaire (Wei, 2006; Huizing et al., 2008; Masliah-Planchon et al., 2013). Ces troubles sont dus à des défauts dans les gènes codants pour des protéines impliquées dans la biogenèse et/ou le fonctionnement des LRO tels que les gènes BLOC, HPS et AP3. Ces gènes sont au nombre de neuf chez l'homme et les mutations de certains de ces gènes peuvent affecter plusieurs organites autres que les granules denses des plaquettes comme les mélanosomes et les granules des lymphocytes T cytotoxiques.

Des mutations dans les gènes *HPS1* et *HPS4*, définissant respectivement les sous-types de maladies HPS1 et HPS4, causent les formes cliniques les plus sévères d'HPS. Les deux protéines HPS1 et HPS4 s'associent pour former le complexe BLOC3 (Figure 12) (Martina et al., 2003). Ce complexe régule la biogenèse et/ou la fonction des corps lamellaires des pneumocytes ce qui explique les complications pulmonaires chez les sujets HPS1 et HPS4. Le sous-type de maladie HPS2 est causé par une mutation du gène *AP3BI*, qui code pour une sous-unité d'AP3 (Feng et al., 1999). AP3 joue un rôle critique dans le tri des protéines et la formation de vésicules dont les granules denses (Dell'Angelica et al., 1999; Feng et al., 1999).

Chez la souris 16 locus sont associés avec le HPS, parmi lesquels HPS6. Le gène *HPS6* code pour la protéine HPS6 présente dans le complexe BLOC2 (Zhang et al., 2003; Di Pietro et al., 2004). Les patients ayant des mutations sur le gène *HPS6* ainsi que les souris

KO pour HPS6 sont déficients en granules denses (Figure 13) (Novak et al., 1984; Zhang et al., 2003; Huizing et al., 2009). L'absence des granules denses est la cause des hémorragies associées au syndrome HPS (Müller et al., 2009).

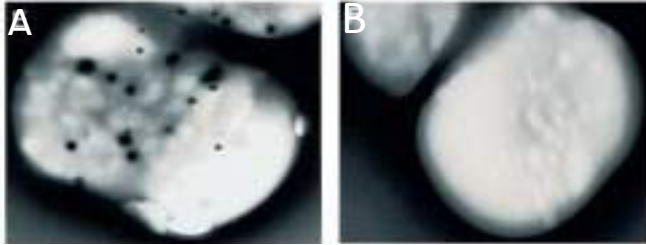


Figure 13 : Microscopie électronique montrant des plaquettes avec des granules denses normaux (A) et des plaquettes d'un patient HPS montrant l'absence de granules denses (B). (Adapté à Huizing et al, 2001).

b) Le syndrome Chediak-Higashi (CHS)

Le CHS est un syndrome autosomal récessif rare caractérisé par un défaut de granules denses associé à une hypopigmentation, des déficits immunologiques et un dysfonctionnement neurologique progressif (Masliah-Planchon et al., 2013). Une caractéristique frappante du CHS est la présence de granules géantes dans plusieurs types cellulaires (LT cytotoxique, NK, mélanosomes...). Il a été démontré qu'une mutation dans le gène *LYST* provoque ce syndrome (Barbosa et al., 1996).

La souris « beige », modèle de souris CHS, a été une source d'informations importante pour caractériser cette pathologie (Barbosa et al., 1996; Perou et al., 1997; Kaplan et al., 2008). Le CHS résulte de mutations du gène *LYST* (lysosomal trafficking regulator)/*CHSI* présent sur le locus 1q42.2 et qui code pour une protéine cytoplasmique de 452 kDa conduisant à la production de la protéine *LYST* tronquée. Des mutations dans le gène *LYST* sont identifiées chez 13 patients CHS (Nagle et al., 1996; Barbosa et al., 1997; Karim et al., 1997; Certain et al., 2000). La protéine *LYST* est exprimée de façon ubiquitaire, elle contient le domaine BEACH et serait impliquée dans le trafic intracellulaire et la genèse des granules denses où elle empêche leur fusion (Nagle et al., 1996). Ainsi, une mutation dans ce gène conduit à un défaut du trafic des protéines intracellulaires qui a pour conséquence entre autres, des défauts de granules denses des plaquettes et des granules des leucocytes. Malgré un compte plaquettaire normal, la fonction plaquettaire est défectueuse, provoquant les troubles hémorragiques chez ces patients. Les patients CHS possèdent les mêmes diathèses que les patients HPS due à l'absence de granules denses, cependant certains patients CHS possèdent un nombre réduit et irrégulier de granules denses. Ces granules possèdent un taux réduit de leurs

constituants (ATP, ADP, calcium, sérotonine...) (Apitz-Castro et al., 1985; Huizing et al., 2001). Des tests d'agrégations faits sur ces patients montrent une absence ou une agrégation minimale suite à une stimulation par différents agonistes (Buchanan and Handin, 1976; Apitz-Castro et al., 1985; Huizing et al., 2001). En plus d'un défaut de stockage dans les granules denses, les plaquettes des patients CHS possèdent des granules ayant une forme géante (Parmley et al., 1979; White, 1978) (Figure 14).

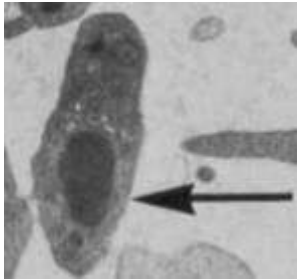


Figure 14 : Microscopie électronique montrant des plaquettes d'un patient CHS. Les plaquettes CHS ne possèdent pas ou très peu de granules denses et les granules sont géants (flèche) (D'après parmley et al ; 1979).

IV. Les mécanismes de libération des granules

L'exocytose du contenu des granules plaquettaires se produit par des mécanismes semblables à ceux utilisés par d'autres cellules sécrétrices comme les neurones. L'exocytose implique une réorganisation du cytosquelette, le mouvement des granules vers la membrane plasmique, une fusion entre la membrane plasmique et la membrane des granules et la libération du contenu intracellulaire (Burgoyne and Morgan, 2003; Flaumenhaft et al., 2005). Cette fusion, initiée et régulée par l'activation de récepteurs de surface (Figure 15), fait intervenir différents membres de la famille SNARE (soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment protein receptor). De façon schématique, l'interaction entre v-SNARE (vesicle SNARE), présente sur la vésicule et t-SNARE (target SNARE), présente sur la membrane plasmique, conduit à la formation d'un complexe appelé trans-SNARE qui déclenche la fusion des vésicules avec les membranes cibles. Les protéines SNARE sont un groupe de molécules provenant de trois superfamilles de gènes qui codent pour les protéines syntaxins, VAMP et SNAP (Heijnen and van der Sluijs, 2015). Toutes les protéines SNARE contiennent un domaine d'environ 60 acides aminés (SNARE motif) qui leur permet de former des complexes oligomériques serrés et stables permettant la fusion membranaire (Heijnen and van der Sluijs, 2015). L'interaction des SNARE est également réglée par un certain nombre de protéines comme les sec1/munc18-2, les munc13-4 et les Rab GTPases, en particulier Rab27b (Golebiewska and Poole, 2013, 2015).

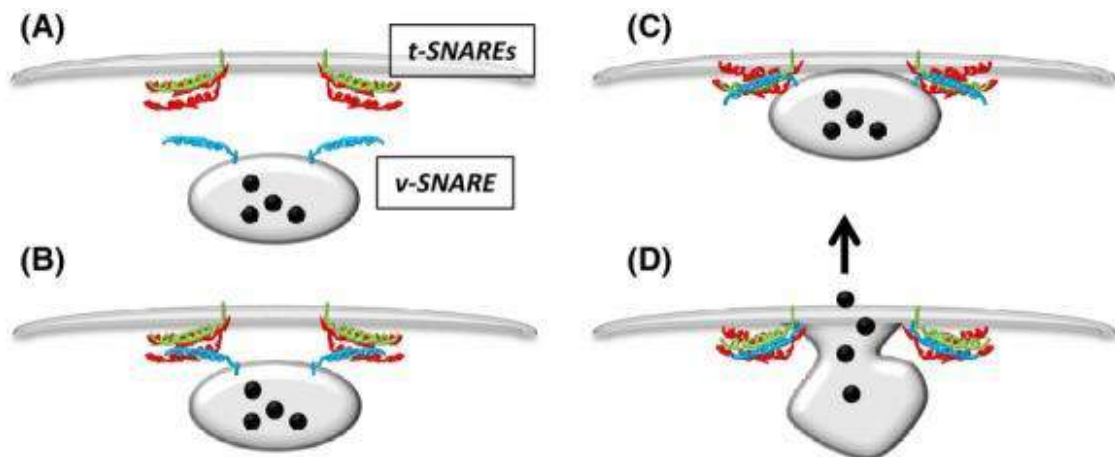


Figure 15 : Schéma montrant l'exocytose des granules. Les v-SNARE et t-SNARE se trouvent sur les membranes opposées. A) en réponse à un stimulus les granules s'approchent de la membrane cible et les domaines SNARE s'associent. B) un changement de forme dans les domaines SNARE rapproche les membranes (C) ce qui leur permet (D) de franchir la barrière d'énergie provoquant ainsi la fusion des membranes et la libération des contenus granulaires. (D'après Golebiewska and Poole, 2013).

La caractérisation des SNARE dans les plaquettes a été rapportée pour la première fois par Lemons *et al*, en 1997 (Lemons et al., 1997). Depuis, les mécanismes de sécrétion des granules plaquettaires ont été étudiés. Il semble que le répertoire de SNARE présent dans les plaquettes soit limité et inclus les v-SNARE : VAMP-2 (vesicle associated membrane protein), VAMP-3, VAMP-7, VAMP-8, SNAP-23, SNAP-29 et les t-SNARE : syntaxin-2 (STX-2), STX-4, STX-7, et STX-11 (Ren et al., 2008). La principale t-SNARE des plaquettes est STX-11 qui se lie à VAMP-8 (Marks, 2012). Des sous-types de maladie auto-immune FHL (familial hemophagocytic lymphohistiocytosis) sont liées à des défauts de sécrétion des granules denses et alpha simultanément à cause de mutations des gènes *Munc13-4*, *STX11* et *Munc18-2* (zur Stadt et al., 2005, 2009; Murata et al., 2011; Al Hawas et al., 2012; Ye et al., 2012). Les études chez ces patients ont permis de montrer que les protéines *secl/munc18-2*, les *munc13-4* et les *Rab27b*, qui s'associent aux SNARE, jouent aussi un rôle important dans l'exocytose des granules (Figure 16). Ces protéines sont considérées comme des chaperonnes de SNARE et forment avec les SNARE un complexe qui sera essentiel à la sécrétion.

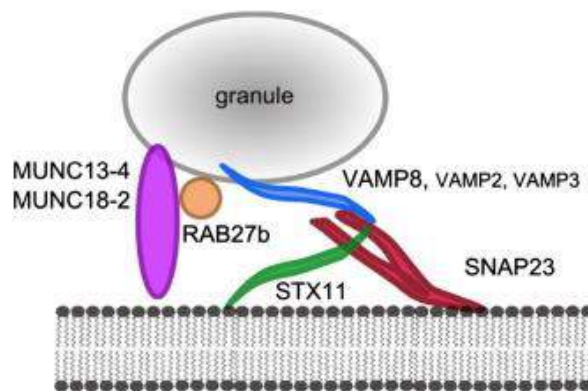


Figure 16 : Modèle montrant la sécrétion des granules plaquettaires. Un complexe SNARE se forme : VAMP8 avec VAMP2 et VAMP3 (bleu) se lie à STX11 (vert) et SNAP23 de la membrane plasmique. MUNC13-4 et MUNC18-2 (violet) ainsi que Rab27 (orange) sont aussi essentiel à la sécrétion. (D'après Golebiewska and Poole, 2013).

Les patients FHL ou les souris VAMP-8 KO possèdent des plaquettes dont l'exocytose des granules denses et alpha est fortement diminuée, cependant elle n'est pas totalement inhibée (Shirakawa et al., 2004; Graham et al., 2009; Ren et al., 2010). Ceci suggère la présence de protéines redondantes qui permettent la mise en place de mécanismes de compensation. Dans le cas d'une déficience de VAMP-8, VAMP-2 et VAMP-3 peuvent par exemple prendre le relais et permettent la sécrétion des granules (Ren et al., 2007; Golebiewska and Poole, 2015).

Les phosphoinositides

I. Introduction générale

Les phosphoinositides (PI) sont des phospholipides membranaires considérés comme composants essentiels des membranes cellulaires des eucaryotes. Ces dérivés phosphorylés du phosphatidylinositol (PtdIns) font partie des glycérophospholipides et sont composés d'une molécule de glycérol estérifiée par deux acides gras et d'un groupement phosphate lui-même lié à une molécule de myo-D-inositol. Les acides gras majoritaires des PI sont l'acide stéarique (C18:0) et l'acide arachidonique (C20:4), respectivement en position 1 et 2 du squelette glycérol (Balla, 2013). Les différents PI sont générés par la phosphorylation, de manière réversible, du noyau inositol par des kinases et des phosphatases spécifiques. La phosphorylation a lieu sur les groupements hydroxyles (-OH) des atomes de carbone en position 3, 4 et 5. La combinaison de ces phosphorylations donne naissance aux sept PI. Au côté du PtdIns qui n'est pas phosphorylé et qui est très largement majoritaire, nous trouvons les phosphatidylinositol monophosphates : le phosphatidylinositol 3-monophosphate (PtdIns3P), le phosphatidylinositol 4-monophosphate (PtdIns4P) et le phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P) ; les phosphatidylinositol bisphosphates : le phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P₂), le phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PtdIns(3,5)P₂) et le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) ; et le phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃) (Figure 17). La quantité basale de ces PI a été mesurée par des approches de biochimie et présente des variations significatives en fonction des types cellulaires (Nasuhoglu et al., 2002; Wenk et al., 2003). De façon globale, les PI représentent 10 à 20% des phospholipides totaux. Le PtdIns est le plus abondant et représente 5 à 8% des phospholipides totaux, les PtdIns4P et les PtdIns(4,5)P₂ représentent 0.2 à 1% tandis que les autres PI sont présents dans la cellule en quantité encore beaucoup plus faible.

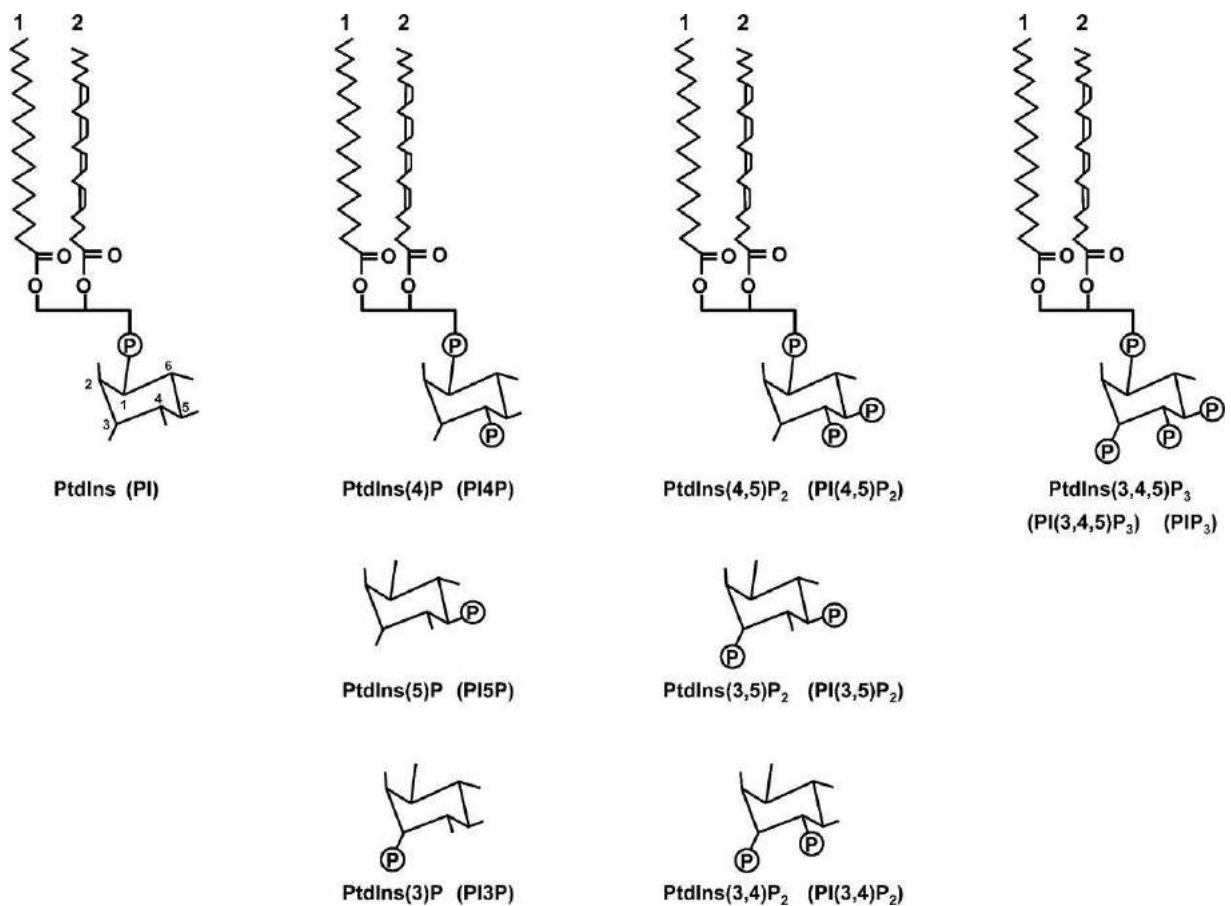


Figure 17 : Famille des phosphoinositides (d'après Hawkins et al ; 2006)

Les PI, en interagissant spécifiquement avec des protéines, organisent de manière spatio-temporelle des complexes protéiques impliqués dans le contrôle de la signalisation intracellulaire, du trafic vésiculaire, de l'apoptose, et de la dynamique du cytosquelette. Un ensemble de kinases et phosphatases spécifiques assure la production et l'interconversion de ces PI, dont le métabolisme est finement régulé. L'implication directe de ces enzymes dans des maladies génétiques, le cancer ou les maladies infectieuses, ainsi que l'arrivée récente d'inhibiteurs ciblant certaines PI kinases en clinique, souligne l'importance de ces lipides et de leur métabolisme dans le domaine biomédical. Le rôle des phosphoinositides dans l'organisation spatiotemporelle de la dynamique cellulaire est traité dans la revue générale intégrée en annexe (Viaud, Mansour et al., 2015). Je décrirai ensuite plus spécifiquement les enzymes impliquées dans le métabolisme du PtdIns5P en particulier les phosphoinositides 3-phosphatases de la famille des myotubularines, la PIP kinase de classe III et PIKfyve ainsi que les phosphoinositides PtdIns3P, PtdIns(3,5)P₂ et surtout PtdIns5P.

II. Les enzymes du métabolisme du PtdIns5P

Il existe trois voies potentielles conduisant à la production du PtdIns5P i) par phosphorylation directe du PtdIns par PIKfyve, ii) par la voie PtdIns3P/PtdIns(3,5)P₂/PtdIns5P qui fait appel à l'action concertée de PIKfyve et des phosphatases de la famille des myotubularines ou iii) par la voie de déphosphorylation du PtdIns(4,5)P₂ en PtdIns5P par une PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatase que je ne développerai pas dans cette revue.

II.1 Les phosphoinositide 3-phosphatases

Les PI 3-phosphatases sont des enzymes qui hydrolysent spécifiquement un groupement phosphate en position 3 de l'inositol des phosphoinositides (Blero et al., 2007). Elles sont divisées en 2 groupes principaux dont le premier contient PTEN (Phosphatases et Tensin homolog deleted on chromosome 10) et le deuxième les myotubularines. Le gène *PTEN* est un gène suppresseur de tumeur (Li et al., 1997) et la protéine PTEN déphosphoryle en position 3 de l'inositol le second messager PtdIns(3,4,5)P₃ qui est son substrat préférentiel (McConnachie et al., 2003).

La famille des myotubularines (MTM) inclut quinze membres (si on inclut MTMR14 ou Jumpy dont le classement dans la famille des myotubularines reste discuté) dont neuf possèdent une activité 3-phosphatase sélectivement ciblée sur le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P₂ (MTM1, MTMR1, MTMR2, MTMR3, MTMR4, MTMR6, MTMR7, MTMR8 et MTMR14) (Kerk and Moorhead, 2010). Les six autres membres (MTMR5, MTMR9, MTMR10, MTMR11, MTMR12 et MTMR13) sont inactifs et s'associent souvent aux MTM actives pour les réguler. En plus de leur domaine catalytique, ces protéines contiennent plusieurs motifs de liaison à des protéines et à des lipides comme les domaines PH-GRAM et FYVE (Doerks et al., 2000; Lorenzo et al., 2005).

En dépit d'une expression ubiquitaire, certaines myotubularines sont spécifiquement impliquées dans des maladies génétiques neuromusculaires. Des mutations dans le gène *MTM1* sont retrouvées chez approximativement 90% des patients ayant une myopathie congénitale sévère dite myopathie myotubulaire/centronucléaire, XLCNM (X-linked CentroNuclear Myopathy) (Laporte et al., 1996, 2000; Billcliff and Lowe, 2014). La plupart de ces patients ont une espérance de vie de quelques années et décèdent suite à un arrêt respiratoire dû à une hypotonie et une atrophie musculaire sévère et progressive.

MTMR2, est impliqué dans la myélinisation des nerfs périphériques (Simons and Trotter, 2007). Une mutation de MTMR2 ou de son partenaire inactif MTMR13 induit deux formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) de type 4B1 et 4B2, respectivement. Cette neuropathie dégénérante affecte la gaine de myéline du système nerveux périphérique (Bolino et al., 2000; Berger et al., 2002; Senderek et al., 2003).

Il a été montré que certaines myotubularines jouent un rôle dans la régulation du trafic vésiculaire et également dans la macroautophagie (Vergne and Deretic, 2010; Dall'Armi et al., 2013). Le rôle des myotubularines dans l'autophagie serait dû au contrôle du taux de PtdIns3P, un lipide nécessaire à la genèse de l'autophagosome. Cependant, d'autres investigations sont nécessaires pour conforter cette hypothèse *in vivo*.

II.2 La PIP 5-kinase de type III : PIKfyve

PIKfyve est le produit d'un gène unique et hautement conservé au cours de l'évolution. Cette lipide kinase de haut poids moléculaire (235 kDa) est l'homologue de Fab1 chez *S. cerevisiae* qui est décrite pour produire du PtdIns(3,5)P₂ *in vitro* et *in vivo*. PIKfyve appartient à la famille des PIP 5-kinase de type III qui sont capables de phosphoryler le PtdIns et le PtdIns3P en position 5 produisant respectivement du PtdIns5P et du PtdIns(3,5)P₂ (Sbrissa et al., 1999). Le rôle de cette kinase dans les mégacaryocytes et les plaquettes est très mal connu mais il a été montré dans divers modèles cellulaires qu'elle contrôle différentes fonctions, en particulier le trafic vésiculaire et l'homéostasie des vésicules intracellulaires. Le rôle de PIKfyve a été décortiqué grâce à l'utilisation d'inhibiteurs (curcumine, YM201636, apilimod) et de modèles de souris génétiquement modifiées. Chez la souris, le gène codant pour mPIKfyve se situe sur le chromosome 1 et contient 42 exons. Ce gène possède trois variants protéiques qui sont issus d'un épissage alternatif. Ces variants diffèrent par la présence ou l'absence de l'exon 4 ou 12'. Bien que cette protéine soit majoritaire dans le tissu adipeux et le muscle, elle est présente de façon ubiquitaire dans les cellules et les tissus (Shisheva et al., 1999). Chez l'homme, le gène codant pour PIKfyve se situe sur le chromosome 2 en position 2q3 et est composé de 41 exons (Shisheva, 2008). La protéine possède plusieurs domaines conservés (Figure 18). Le domaine FYVE situé en N-terminal permet la localisation de PIKfyve sur les compartiments riches en PtdIns3P, son substrat, expliquant en partie sa localisation sur des vésicules.

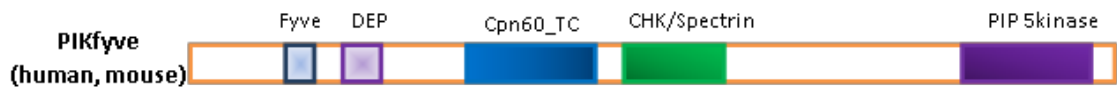


Figure 18 : Représentation schématique de PIKfyve et des divers domaines qui la composent

a) Localisation de PIKfyve

Des données obtenues après fractionnement cellulaire sur les adipocytes 3T3-L1 ou sur des cellules de chromaffines, indiquent la présence de plusieurs pools endogènes de PIKfyve (Shisheva et al., 2001; Osborne et al., 2008). D'après une étude faite en 2001 par Shisheva *et al.*, PIKfyve endogène est présente à 76% dans le cytosol, 20% dans les endomembranes et 4% à la membrane plasmique (Shisheva et al., 2001). Dans ces cellules, PIKfyve présente une localisation vésiculaire, cependant, la caractérisation de ces vésicules n'avait pas été réalisée. L'expression ectopique de PIKfyve a permis de définir les compartiments riches en PIKfyve par microscopie à fluorescence et montre que cette kinase possède une distribution vésiculaire et ponctiforme (Ikonomov et al., 2001, 2006; Cabezas et al., 2006; Rutherford et al., 2006). Sur certaines cellules, l'expression ectopique de PIKfyve^{WT} montre une colocalisation partielle avec les endosomes tardifs et le TGN (Griffiths et al., 1990; Rohn et al., 2000). Dans d'autres types cellulaires, PIKfyve exprimée de façon ectopique se trouve sur les endosomes précoces riches en EEA1 (Cabezas et al., 2006; Rutherford et al., 2006). Il semblerait que PIKfyve soit recrutée aux endosomes précoces de façon dépendante du PtdIns3P qui interagit avec son domaine FYVE puis transforme le PtdIns3P en PtdIns(3,5)P₂ (Ikonomov et al., 2006). PIKfyve se retrouverait ensuite sur les endosomes tardifs et le TGN et dans le cytosol. Les différences de niveau d'expression et de localisation de PIKfyve^{WT} observées dans différents types cellulaires pourraient être en relation avec son activité enzymatique qui régule la balance entre le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P₂ et phosphoryle le PtdIns en PtdIns5P (Sbrissa et al., 2002a; Rutherford et al., 2006).

b) Activités de PIKfyve

PIKfyve est une lipide kinase capable de phosphoryler spécifiquement le PtdIns et le PtdIns3P en position 5 du noyau inositol (Sbrissa et al., 1999). Ainsi, une surexpression de PIKfyve dans différents types cellulaires de mammifères augmente le taux de PtdIns(3,5)P₂, tandis qu'une abolition de PIKfyve par siRNA ou par dominant négatif PIKfyve^{K1831E} diminue son taux (Ikonomov et al., 2001; Sbrissa and Shisheva, 2005;

Sbrissa et al., 2007). Dans la levure la synthèse de PtdIns(3,5)P₂ à partir du PtdIns3P par Fab1, l'orthologue de PIKfyve, a été montrée en 1997 (Dove et al., 1997; Whiteford et al., 1997). Chez les mammifères, le fait que PIKfyve intervient dans cette synthèse ne fut clairement démontrée qu'en 1999 lors de l'identification de cette enzyme (Shisheva et al., 1999) et la caractérisation de son activité lipide kinase *in vitro* (McEwen et al., 1999; Sbrissa et al., 1999). Des données obtenues par des techniques d'analyse HPLC ont aussi confirmé l'implication de PIKfyve dans la biosynthèse du PtdIns(3,5)P₂ à partir du PtdIns3P après expression ectopique de PIKfyve^{WT} (Ikonomov et al., 2001). Il est cependant difficile de quantifier le PtdIns(3,5)P₂ car ce lipide est présent en faible quantité dans les cellules de mammifères (Sbrissa and Shisheva, 2005).

Plusieurs travaux suggèrent que PIKfyve est responsable de la biosynthèse du PtdIns5P dans les cellules de mammifères. PIKfyve est capable de synthétiser du PtdIns5P *in vitro* à partir de PtdIns et sa surexpression dans des cellules de mammifères augmente le taux de PtdIns5P (Sbrissa et al., 1999, 2002b). La déplétion de la protéine PIKfyve par siRNA ou l'inhibition de son activité par la curcumine provoque une baisse du PtdIns5P (Coronas et al., 2008). Une autre étude, basée sur la quantification par HPLC des PI dans des fibroblastes de souris, a mis en évidence l'implication de PIKfyve dans la production du PtdIns5P. Cette étude montre que le taux de PtdIns5P diminue de 40% dans les souris hétérozygotes PIKfyve^{WT/KO} (Ikonomov et al., 2011). De plus, chez les souris déficientes en ArPIKfyve, un régulateur de l'activité de PIKfyve, une diminution du taux de PtdIns5P ainsi que du PtdIns(3,5)P₂ a été mesurée (Zhang et al., 2007). Enfin, l'inhibition de PIKfyve par un inhibiteur pharmacologique, le YM201636, diminue la biosynthèse du PtdIns5P ainsi que celle du PtdIns(3,5)P₂. Il est toutefois intéressant de noter qu'à une dose de 160 nM, l'YM201636 entraîne une diminution de la production du PtdIns5P deux fois plus importante que celle du PtdIns(3,5)P₂ (Sbrissa et al., 2012). Cependant, la production du PtdIns5P par PIKfyve pourrait en fait être indirecte. En effet, il est possible que PIKfyve puisse préférentiellement produire du PtdIns(3,5)P₂ qui serait ensuite déphosphorylé en PtdIns5P par les 3-phosphatases de la famille des myotubularines (Walker et al., 2001; Tronchère et al., 2004; Michell et al., 2006).

Outre son activité lipide kinase, PIKfyve possède une activité protéine kinase encore assez mal caractérisée. La première étude rapportant cette activité, a montré la capacité de PIKfyve à s'autophosphoryler (Sbrissa et al., 2000). PIKfyve peut aussi phosphoryler plusieurs substrats protéiques *in vitro*, parmi lesquels le facteur de transport p40 de Rab9

qui s'associe à PIKfyve (Ikonomov et al., 2003a). Comme Sac3/FIG4 et ArPIKfyve qui s'associent à PIKfyve sont phosphorylées dans les cellules quiescentes (Ikonomov et al., 2009a), ces deux protéines ont été proposées comme des substrats protéiques potentiels de PIKfyve.

Dans un contexte cellulaire, il semblerait que l'activité lipide kinase de PIKfyve soit régulée par l'activité protéine kinase de cette enzyme. En effet, il a été démontré *in vitro* que l'autophosphorylation de PIKfyve inhibe son activité lipide kinase (Sbrissa et al., 2000).

c) Interaction avec des partenaires

PtdIns3P

Le domaine FYVE de PIKfyve lie le PtdIns3P comme démontré *in vitro* par des tests de liaisons aux liposomes (Sbrissa et al., 2002a). Un traitement à la wortmannine, un inhibiteur non spécifique des PI3K, qui diminue le taux de PtdIns3P, ainsi qu'une mutation ponctuelle du domaine FYVE de PIKfyve entraîne la perte de la localisation vésiculaire de PIKfyve dans plusieurs types cellulaires (Sbrissa et al., 2002a; Berwick et al., 2004; Ikonomov et al., 2006; Rutherford et al., 2006).

ArPIKfyve/sac3

ArPIKfyve (Associated Regulator of PIKfyve) est une protéine codée par le gène *VAC14* et est conservée au cours de l'évolution. Cette protéine s'associe à PIKfyve et régule la production de PtdIns(3,5)P₂ et de PtdIns5P (Sbrissa et al., 2004a; Sbrissa and Shisheva, 2005; Shisheva et al., 2015). Une étude montre, dans des souris KO pour ArPIKfyve, une diminution des taux de PtdIns(3,5)P₂ et de PtdIns5P ainsi qu'une augmentation du taux de PtdIns3P (Zhang et al., 2007), confirmant son implication dans le contrôle de l'activité catalytique de PIKfyve. ArPIKfyve se lie à PIKfyve et à la phosphatase Sac3/FIG4 pour former un complexe PAS (PIKfyve-ArPIKfyve-Sac3) stable qui régule l'activité de PIKfyve (Sbrissa et al., 2007, 2008). Sac3/FIG4 appartient à la famille des protéines à domaine SAC qui possède une activité PI phosphatase. Elle hydrolyse *in vitro* les PI en position 3,4 ou 5 du noyau inositol (Blagoveshchenskaya and Mayinger, 2009; Majerus and York, 2009). Cependant, *in vivo* Sac3/FIG4 serait plutôt une PI 5-phosphatase qui hydrolyse préférentiellement le PtdIns(3,5)P₂ pour produire du PtdIns3P.

P40 effecteur de Rab9 et l'adaptateur JLP_L

PIKfyve interagit avec la protéine p40, qui elle-même va lier Rab9. Ce complexe va interagir avec l'adaptateur de la kinésine JLP et vont lier par ce fait PIKfyve aux microtubules. Ce complexe serait impliqué dans le transport des endosomes vers le réseau Trans Golgi (Ikonomov et al., 2003a, 2009b).

La PI3K de classe IA

Une interaction entre PIKfyve et la sous-unité p85 de la PI3K de classe IA a été mise en évidence par co-immunoprécipitation sur les adipocytes 3T3-L1 (Sbrissa et al., 2001). En réponse à l'insuline, cette interaction entraîne une augmentation de l'activité d'une PI3-kinase de classe I dans des immunoprécipités de PIKfyve. Cependant, il existe peu de données sur la signification fonctionnelle d'une telle interaction.

Le récepteur à l'EGF

Une interaction entre PIKfyve et l'EGFR a été identifiée par spectrométrie en masse dans des cellules cancéreuses humaines (Kim et al., 2007). Cette association est augmentée d'un facteur dix après stimulation de l'EGFR par le facteur de croissance HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor). Dans ce modèle, une fraction de l'EGFR serait transloquée dans le noyau d'une façon dépendante de l'activité de PIKfyve.

Cav1.2

Cav1.2 est un canal calcique qui joue un rôle important dans le cerveau (Tsien et al., 1991). PIKfyve a été récemment identifiée comme un partenaire de Cav1.2 dans une analyse par spectrométrie de masse de protéines co-immunoprécipitées avec Cav1.2 dans les neuroblastomes (Tsuruta et al., 2009). Le site d'interaction avec PIKfyve a été identifié dans la partie C-terminale du canal. En se liant à Cav1.2, PIKfyve régule son internalisation et sa dégradation (Tsuruta et al., 2009).

NPM-ALK

Notre équipe a observé des niveaux élevés de PtdIns5P dans les cellules exprimant l'oncogène NPM-ALK et ce de façon dépendante de PIKfyve (Coronas et al., 2008). PIKfyve s'associe physiquement avec NPM-ALK et l'activité tyrosine kinase de cet oncogène contrôle l'activité lipide kinase de PIKfyve. L'inactivation par siRNA de

PIKfyve ou l'inhibition de son activité kinase par le YM201636 n'a pas d'effet sur la prolifération et la migration cellulaire induite par NPM-ALK mais réduit fortement les capacités invasives des cellules et leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire en perturbant la sécrétion de la métalloprotéinase MMP9 (Dupuis-Coronas et al., 2011).

d) Régulation de PIKfyve par Akt et l'AMPK

La protéine kinase Akt joue un rôle important dans de multiples processus cellulaires comme le métabolisme du glucose, l'apoptose, la prolifération, la transcription ou la migration cellulaire (Risso et al., 2015). En réponse à l'insuline, il a été montré qu'Akt phosphoryle PIKfyve sur la serine 318, ce qui augmente son activité kinase (Berwick et al., 2004). Cependant, il a été suggéré que la phosphorylation de cette serine pouvait être due à l'autophosphorylation de PIKfyve et non pas de l'activité de Akt (Ikonomov et al., 2007). Néanmoins, deux études démontrent qu'une stimulation par l'insuline ou un stress hyper-osmotique induisent la phosphorylation de PIKfyve d'une façon dépendante de Akt (Berwick et al., 2004; Hill et al., 2010). Hill *et al.* ont aussi montré que la serine 105 représente un deuxième site de phosphorylation de PIKfyve par Akt (Hill et al., 2010). D'un point de vue fonctionnel, il a été rapporté que la phosphorylation et l'activation de PIKfyve par Akt contribue à la dégradation de l'EGFR. En effet, suite à l'inhibition d'Akt, PIKfyve est moins active et le trafic de l'EGFR depuis les endosomes précoces est réduit, ce qui diminue le taux de dégradation de l'EGFR (Er et al., 2013). Ainsi, PIKfyve contrôlerait la dégradation de l'EGFR suite à son activation dépendante d'Akt. Enfin, une étude a montré que PIKfyve pouvait être également phosphorylée par l'AMPK (AMP-activated protein kinase) sur la serine 307 sans que l'activité lipide kinase de PIKfyve ne soit affectée (Liu et al., 2013).

e) Rôle de PIKfyve dans les processus biologiques

Rôle dans l'homéostasie des membranes dans le système endosomal

La première évidence que l'activité de PIKfyve contrôle l'homéostasie des membranes des endosomes vient de l'observation de l'apparition de vacuoles élargies lors de l'expression du mutant catalytiquement inactif PIKfyve^{K1831E}. Ce phénomène est reversé lors de la surexpression de PIKfyve^{WT} (Ikonomov et al., 2001). Au départ, ces vacuoles

sont positives pour EEA1 et Rab5 puis vont évoluer graduellement pour former une population hétérogène de vacuoles d'origine hybride (Ikonomov et al., 2006). Ce phénotype spectaculaire de formation de vacuoles élargies est reproduit par invalidation de l'expression de PIKfyve par siRNA, ou par inhibition de son activité catalytique par des inhibiteurs pharmacologiques (Rutherford et al., 2006; Jefferies et al., 2008; Osborne et al., 2008; de Lartigue et al., 2009; Cai et al., 2013). Différentes données sur la caractérisation de ces vacuoles élargies, ont montré que leur formation apparaît à partir des endosomes précoces, des endosomes tardifs ou des deux types d'endosomes. La nature de ces vacuoles élargies varie selon les études et les modèles cellulaires étudiés ce qui est probablement relié à l'aspect progressif de cette aberration morphologique en relation avec le niveau d'inhibition de PIKfyve.

Les mécanismes cellulaires qui déclenchent l'élargissement des endosomes après inhibition de PIKfyve sont encore mal connus. Cette formation de vacuoles pourrait être due à une dérégulation de la balance entre fission et fusion du système endosomal, qui est un évènement clé dans la formation d'un réseau dynamique des structures endosomales au cours du transport endocytaire (Ikonomov et al., 2006). Il est proposé que le PtdIns(3,5)P₂ régule négativement la fusion des endosomes précoces et des corps multivésiculaires (MVB) contribuant à la propriété dynamique de ces membranes (Ikonomov et al., 2006). Une autre étude suggère que la dynamique des endosomes précoces dans le transport des protéines cargo est augmentée par la production du PtdIns(3,5)P₂ membranaire (Sbrissa et al., 2007). Ces observations sont en accord avec un contrôle strict du taux de PtdIns(3,5)P₂ par PIKfyve et les phosphatases Sac3/FIG4 et myotubularines qui seraient respectivement associées aux évènements de fusion et de fission dans le système endosomal. Comme évoqué précédemment, il a été montré que PIKfyve contrôle la dégradation de l'EGFR suite à son activation par Akt (Er et al., 2013). De même, dans un contexte d'infection bactérienne par *Shigella flexneri*, l'enrichissement d'un produit potentiel de PIKfyve, le PtdIns5P, dans les endosomes précoces maintient l'activité signalétique de l'EGFR dans des endosomes signalants (Ramel et al., 2011) et inhibe sa dégradation *via* les lysosomes en recrutant la protéine TOM-1 (Boal et al., 2015). Notre équipe a également montré qu'une augmentation du taux de PtdIns5P à la membrane plasmique induit l'internalisation d'ICAM-1 et sa dégradation par les lysosomes. Ceci montre le rôle complexe et déterminant du PtdIns5P dans l'induction et l'orientation du trafic endosomal (Boal et al., 2016). Récemment, une étude a montré que PIKfyve jouait un rôle clé dans la maturation

des endosomes tardifs et qu'une perte de PIKfyve entraînait le décrochage des endosomes tardifs des microtubules (Hirano et al., 2015).

PIKfyve pourrait aussi avoir un rôle dans la dynamique interne des endosomes tardifs ou corps multivésiculaires (MVB). Les vésicules intra-luminales (ILV) sont générées à partir de l'invagination et la fission de la membrane limitante des MVB (Ikonomov et al., 2003b; van der Goot and Gruenberg, 2006; Stuffers et al., 2009). En effet, les ILV dans les MVB représentent une population hétérogène de vésicules, dont certaines sont impliquées dans le transport des récepteurs vers les lysosomes, et d'autres re-fusionnent avec les membranes pour être exportées vers d'autres destinations (van der Goot and Gruenberg, 2006; Falguières et al., 2009). Dans des cellules HEK293 exprimant le dominant négatif PIKfyve^{K1831E}, les MVB apparaissent élargis et contiennent moins de vésicules ILV, montrant l'implication de PIKfyve dans la régulation de la dynamique des ILV (Ikonomov et al., 2003b). De plus, une réduction du nombre de ces vésicules est aussi observée dans les MVB chez la levure *S. cerevisiae* et la drosophile après inactivation de Fab1/PIKfyve (Gary et al., 1998; Rusten et al., 2006).

Rôle dans le transport et la régulation des canaux ioniques

Des études ont montré que l'activation de la kinase SGK1 (serum and glucocorticoid inducible kinase) induit la phosphorylation de PIKfyve qui participerait à la régulation et au transport de certains canaux ioniques (Na⁺, K⁺, Cl⁻) (Seebohm et al., 2007; Shojaiefard et al., 2007; Gehring et al., 2009; Klaus et al., 2009). De plus, des travaux suggèrent que PIKfyve pourrait modifier l'activité des canaux Ca²⁺ suite à la production du PtdIns(3,5)P₂ (Dong et al., 2010). PIKfyve et son produit, le PtdIns(3,5)P₂, sont impliqués dans le trafic et le transport d'autres canaux, comme les canaux TRPV6 (transient receptor potential cation channel) et les récepteurs à la ryanodine, distribués sur plusieurs organites et contrôlant l'entrée et la libération du Ca²⁺ (Shen et al., 2009; Sopjani et al., 2010; Touchberry et al., 2010; Silswal et al., 2011;).

Rôle dans le trafic vers le réseau Trans Golgien (TGN)

Certaines protéines transmembranaires internalisées sont transportées vers le réseau Trans-Golgien (TGN) via le transport rétrograde (Bonifacino and Rojas, 2006). Ce transport rétrograde des endosomes vers le TGN pourrait dépendre de PIKfyve. Comme déjà mentionné précédemment, PIKfyve interagit avec la protéine JLP. Cette interaction

permet le transport de la furine, une protéine résidente du TGN, le long des microtubules. L'inhibition de PIKfyve retarde l'arrivée de la furine vers le TGN (Ikonomov et al., 2009b). De plus, l'association de PIKfyve à p40 et Rab9 permet le transport vers le TGN de CI-MPR (cation independant mannose 6-phosphate Recepteur), un récepteur résidant du TGN. Ainsi, l'inhibition de PIKfyve retarde l'arrivée du CI-MPR vers le TGN (Rutherford et al., 2006; Ikonomov et al., 2009b).

Rôle dans le trafic vers la membrane plasmique

Le rôle de PIKfyve dans l'exocytose a été bien caractérisé dans le cas du transporteur de glucose GLUT4. Celui-ci transporte le glucose du milieu extracellulaire dans les adipocytes et les cellules musculaires en réponse à l'insuline (Huang and Czech, 2007; Foley et al., 2011). Dans des conditions basales, les pools de GLUT4 se trouvent dans des compartiments endosomaux qui se mobilisent vers la membrane plasmique suite à une stimulation par l'insuline. Il a été montré que suite à une réponse aigue à l'insuline, les taux du PtdIns(3,5)P₂ et du PtdIns5P augmentent significativement (Sbrissa et al., 2004b). De façon intéressante, la délétion ou l'inhibition de PIKfyve réduit la translocation de GLUT4 vers la membrane plasmique des adipocytes 3T3-L1 en réponse à l'insuline ce qui a pour conséquence une diminution de l'entrée de glucose (Ikonomov et al., 2002, 2007, 2009c). Le complexe PAS joue un rôle important dans ces processus. Par exemple, une perte de PIKfyve et de ArPIKfyve, qui entraîne une diminution du pool du PtdIns(3,5)P₂, conduit à une diminution plus importante de l'absorption du glucose après stimulation par l'insuline que la seule perte de PIKfyve (Ikonomov et al., 2007). De même, la perturbation de l'intégrité du complexe PAS empêche la translocation de GLUT4 vers la membrane plasmique (Sbrissa et al., 2008). Inversement, une déplétion partielle de Sac3/FIG4 ou l'expression d'un mutant dont l'activité phosphatase est inactive, augmente la translocation de GLUT4 vers la membrane plasmique et l'absorption du glucose en réponse à l'insuline (Ikonomov et al., 2009a). L'ensemble de ces données indiquent que le complexe PAS, le PtdIns(3,5)P₂ et le PtdIns5P sont des régulateurs positifs de l'entrée de glucose via GLUT4.

Rôle dans le noyau

Deux études réalisées dans les cellules de mammifères et la levure ont montré l'implication de PIKfyve et Fab1 dans la transmission de signal vers le noyau pour réguler la transcription génétique. Comme évoqué précédemment, il a été montré que PIKfyve

contribue au trafic du récepteur de l'EGF vers le noyau (Kim et al., 2007). La stimulation par l'EGF augmente l'association de l'EGFR à PIKfyve ce qui contribue à l'association de l'EGFR avec le promoteur de la cycline D1 et la progression du cycle cellulaire. L'inactivation de PIKfyve inhibe la localisation nucléaire de l'EGFR et son association à la chromatine, ayant pour conséquence l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G0-G1. De plus, une étude réalisée chez la levure a montré une interaction entre le PtdIns(3,5)P₂ et deux facteurs qui contrôlent les régulateurs transcriptionnels Tup1 et Cti6 (Han and Emr, 2011, 2013). Dans des levures mutantes pour Fab1 la formation du complexe entre Cti6, Tup1 et les régulateurs transcriptionnels est inhibée. Cependant, il n'est toujours pas clair si PIKfyve et/ou Fab1 transloque dans le noyau et si le pool de PtdIns5P du noyau, qui régule l'expression des gènes et le cycle cellulaire (Jones et al., 2006; Viaud et al., 2014a), provient de PIKfyve ou d'une inhibition de la PtdIns5P 4-kinase de classe II.

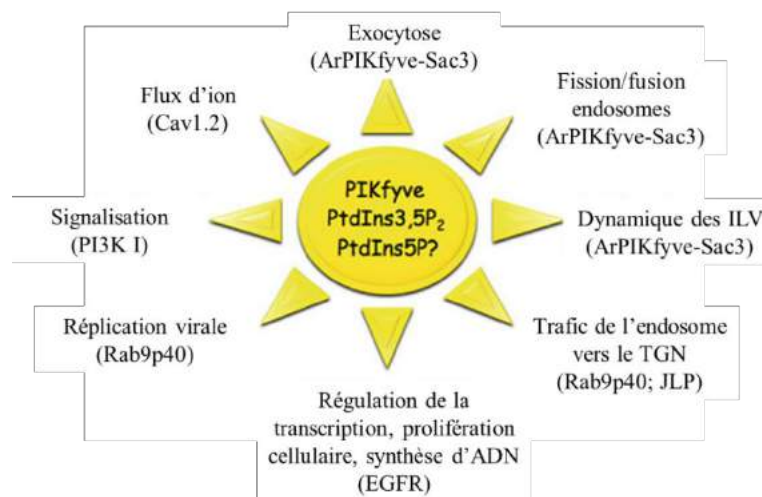


Figure 19 : Fonctions de PIKfyve et de ses produits le PtdIns5P et le PtdIns(3,5)P₂. (D'après Shisheva, 2012)

f) Conséquences physiopathologiques d'une perturbation de PIKfyve

Contrairement aux levures où la délétion de Fab1 n'est pas létale mais provoque la formation de vacuoles aberrantes, PIKfyve est indispensable à la vie des organismes multicellulaires et une inactivation de son expression chez la souris entraîne des défauts de développement et une létalité précoce. La perte totale de PIKfyve chez *C. elegans* induit également une létalité au stade embryonnaire, alors qu'une perte partielle de ses fonctions cause un retard de développement (Nicot et al., 2006). De même, la délétion de PIKfyve chez la drosophile conduit à une létalité au stade larvaire (Rusten et al., 2006). Dans ces deux derniers modèles, les structures endo-lysosomales se trouvent élargies avec une perte d'acidité, sans autres aberrations morphologiques.

Le premier modèle de souris KO a révélé les fonctions de cette kinase dans un organisme et mis à jour son importance dans les phénomènes de survie cellulaire et de développement au stade embryonnaire (Ikonomov et al., 2011). En effet, les embryons PIKfyve^{KO/KO} meurent à un stade très précoce (32-64 cellules), montrant l'importance de cette kinase durant les premiers stades. Par contre, les souris hétérozygotes sont viables et présentent une réduction de 40% du taux de PtdIns(3,5)P₂ et PtdIns5P. Un seul allèle de PIKfyve suffit donc pour le développement normal chez la souris (Ikonomov et al., 2011).

Un autre modèle d'inactivation de PIKfyve chez la souris a été généré par le système «gene-trap», par insertion dans le gène PIKfyve d'une séquence β -geo (PIKfyve ^{β -geo/ β -geo}). Cet hypomorphe présente 10% de la quantité normale de la protéine PIKfyve et une diminution de 50% du taux de PtdIns5P et de PtdIns(3,5)P₂. Les souris PIKfyve ^{β -geo/ β -geo} sont viables mais présentent des maladies neurodégénératives et des défauts au niveau du cœur, des poumons, de la rate et du thymus (Zolov et al., 2012).

Enfin, la génération de souris KO PIKfyve muscle spécifique par la technique Cre-loxP provoque une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline. Cette étude montre la relation entre le système d'homéostasie du glucose et PIKfyve dans les muscles squelettiques chez la souris (Ikonomov et al., 2013).

Chez l'homme, des mutations de PIKfyve sont liées à une forme rare de dystrophie cornéenne mouchetée (CFD) (Li et al., 2005; Kotoulas et al., 2011; Kawasaki et al., 2012; Gee et al., 2015). Plusieurs mutations entraînant la production d'une protéine tronquée dans son domaine catalytique ont été retrouvées chez ces patients (Li et al., 2005; Gee et al., 2015).

PIKfyve pourrait aussi jouer un rôle dans certains cancers humains. L'équipe a montré que la capacité invasive de l'oncogène NPM-ALK, une tyrosine kinase constitutivement active responsable des lymphomes anaplasiques à grandes cellules, est augmentée par son interaction avec PIKfyve (Dupuis-Coronas et al., 2011). L'inhibition de PIKfyve diminue les capacités invasives de cellules exprimant NPM-ALK en perturbant la sécrétion de MMP9 et la digestion de la matrice extracellulaire. Cet effet pourrait être en relation avec la production du PtdIns5P de façon PIKfyve dépendante, puisque dans les lymphomes NPM-ALK positifs, un taux élevé de PtdIns5P est observé (Coronas et al., 2008).

Des travaux ont montré que certains patients atteints de la neuropathie motrice et sensorielle Charcot-Marie-Tooth 4 J (CMT4 J) sont mutés pour *Sac3/FIG4* (Chow et al., 2007; Zhang et al., 2008). Cette maladie de forme récessive se traduit par une démyélinisation des axones. En absence de *Sac3*, *ArPIKfyve* ne s'associe pas efficacement à *PIKfyve*, suggérant que la pathologie CMT4J pourrait être liée à la perte d'activité de *PIKfyve* et de la production du $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ (Ikononov et al., 2010). Ces données sont soutenues par une autre étude faite sur des fibroblastes de patients atteints de la pathologie CMT4J où la protéine *Sac3/FIG4* est absente (Lenk et al., 2011). Cette mutation de *FIG4*, donne une protéine instable *in vivo* et qui n'est plus capable de se lier à *ArPIKfyve* (Lenk et al., 2011).

g) Les inhibiteurs pharmacologiques de *PIKfyve*

La première description d'un inhibiteur pharmacologique de *PIKfyve* a été publiée en 2002 et concernait la curcumine qui reste cependant un inhibiteur peu sélectif (Ikononov et al., 2002a). Les travaux de Jefferies *et al.* ont mis en évidence un nouvel inhibiteur de *PIKfyve*, le YM201636, une pyridofuropyrimidine, au cours d'un criblage d'inhibiteurs des PI 3-kinases. Le YM201636, présente un IC_{50} de 33 nM pour *PIKfyve* (Jefferies et al., 2008). Le traitement de différents types cellulaires avec le YM201636 conduit à la formation de vacuoles internes élargies et induit une diminution d'environ 80% du taux de $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ (Jefferies et al., 2008). Les vacuoles élargies formées après traitement à l'YM201636 sont comparables à celles formées lors de l'abolition de l'expression de *PIKfyve* par siRNA (Rutherford et al., 2006). Il faut noter aussi que cet inhibiteur semble être spécifique de *PIKfyve* chez les mammifères, puisque cette molécule n'a pas d'effet sur *Fab1*, l'orthologue de *PIKfyve* chez la levure (Jefferies et al., 2008). Plus récemment, deux autres inhibiteurs pharmacologiques de l'activité kinase de *PIKfyve*, aux structures proches du YM201636, ont été caractérisés : l'apilimod ou STA5326 (Cai et al., 2013) et le APY0201 (Hayakawa et al., 2014). L'apilimod est une molécule développée spécifiquement pour bloquer la production d'IL-12 et d'IL-23 induite par activation des TLR et qui a fait l'objet d'un essai clinique (Wada et al., 2007, 2012). Elle a été testée chez des patients ayant la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis (Billich, 2007; Wada et al., 2012). Cai *et al.* ont montré élégamment que l'apilimod se lie spécifiquement à *PIKfyve* et inhibe son activité lipide kinase ainsi que l'expression des cytokines induites par les TLR (Cai et al., 2013). L'apilimod possède une IC_{50} de 14 nM

pour PIKfyve et n'a pas d'effet sur d'autres lipides et protéines kinases (Cai et al., 2013). Il semble donc être un inhibiteur plus sélectif et efficace que l'YM201636 qui inhibe certaines PI3K (Jefferies et al., 2008; Ikononov et al., 2009c). Après traitement à l'apilimod, une diminution du PtdIns(3,5)P₂ est observée ainsi que la formation de vésicules élargies (Cai et al., 2013). Enfin, APY0201, une molécule qui inhibe la production d'IL-12/23 par les macrophages et les monocytes, s'associe à PIKfyve (Hayakawa et al., 2014). APY0201 est présenté comme un puissant et sélectif inhibiteur de PIKfyve qui bloque la conversion du PtdIns3P en PtdIns(3,5)P₂ (Hayakawa et al., 2014).

h) Rôle de PIKfyve dans les mégacaryocytes et les plaquettes

Il existe très peu de données concernant PIKfyve dans les mégacaryocytes et les plaquettes. Cependant, une étude récente réalisée chez des souris présentant une invalidation tissu spécifique de PIKfyve dans les mégacaryocytes et les plaquettes, a montré que PIKfyve est nécessaire à la genèse et au fonctionnement normal des lysosomes des plaquettes (Min et al., 2014). PIKfyve serait essentielle pour le stockage et le relargage des enzymes lysosomales. En effet, l'invalidation de PIKfyve dans la lignée mégacaryocytaire des souris conduit à un excès de stockage des protéines et des enzymes lysosomales dans les plaquettes. Or, les lysosomes font partie des organites sécrétés par les plaquettes lors de leur activation. Parmi ces protéines on note la cathepsine D, la cathepsine B et la maltase. En fait, les plaquettes de ces souris contiennent majoritairement la pro-cathepsine D qui est la forme immature et inactive de la cathepsine D. La pro-cathepsine D est normalement transportée du TGN vers les lysosomes où elle mature. PIKfyve semble donc jouer un rôle dans le trafic des protéines cargo lysosomales dans les mégacaryocytes et les plaquettes ainsi que dans leur maturation.

Min *et al.* montrent que PIKfyve n'est pas indispensable au développement des MK ni à la production des plaquettes. Les MK provenant de ces souris présentent des vacuoles élargies et malgré cette anomalie, aucune différence dans le nombre des mégacaryocytes, dans la ploïdie et dans le compte plaquettaire n'a été observée comparé aux souris WT. Ces travaux suggèrent que la perte de PIKfyve n'affecte pas la maturation des mégacaryocytes. Cette étude n'a cependant pas étudié en détail les granules denses et alpha que nous montrons très perturbés dans notre étude suite à l'inhibition

pharmacologique de PIKfyve (partie résultats article 2 : Rôle de PIKfyve et du PtdIns5P dans la dynamique et l'intégrité des granules plaquettaires). Les deux modèles ne sont toutefois pas comparables car nous inhibons PIKfyve alors que les granules sont déjà formés et nous étudions donc la maintenance des granules et de leur intégrité/identité, alors que le modèle de souris n'exprimant plus PIKfyve dans les mégacaryocytes s'intéresse à la genèse des organites et a certainement permis la mise en place de mécanismes compensatoires.

De façon surprenante, les souris présentant une invalidation tissue spécifique de PIKfyve dans les mégacaryocytes et les plaquettes présentent une réponse inflammatoire exacerbée avec la présence de macrophages qui s'accumulent dans divers tissus. Ceci provoque une organomégalie chez ces souris suggérant que la diminution du taux du PtdIns(3,5)P₂ dans les mégacaryocytes et les plaquettes entraîne des défauts importants dans d'autres types cellulaires. Cependant, cette réponse inflammatoire pourrait être due également à l'expression de PF4 non restreinte à la lignée mégacaryocytaire. En effet, il a été montré une expression de l'ARNm de PF4 dans les lymphocytes T, les monocytes et les fibres musculaires lisses (Pertuy et al., 2015). En conséquence, ces souris présentent un retard de croissance, une réduction de la masse grasseuse, une réduction de la densité osseuse et une infertilité.

III. Rôle et localisation des phosphoinositides

III.1 PtdIns3P

Ce lipide est présent en faible quantité dans les cellules eucaryotes et est généré essentiellement à partir du PtdIns par les PI3K de classe II et III (Vps34). Il est aussi produit par déphosphorylation du PtdIns(3,5)P₂ par Fig4 (Rudge et al., 2004). Il semblerait que la PI3K de classe II ainsi que Fig4 soient responsables du pool de PtdIns3P présent dans la membrane plasmique tandis que Vps34 produit le pool de PtdIns3P présent sur les endosomes (Siddhanta et al., 1998; Maffucci et al., 2003; Slessareva et al., 2006; Falasca et al., 2007; Valet et al., 2015). Il faut aussi noter que Vps34 joue un rôle dans l'autophagie en produisant du PtdIns3P dans les autophagosomes (Kihara et al., 2001). Aucune étude n'a décrit une variation importante de la quantité du PtdIns3P dans les cellules à l'exception des cellules infectées par le pathogène *Plasmodium falciparum*

qui présentent une augmentation très importante du taux de PtdIns3P (Tawk et al., 2010). Cependant, plusieurs stimuli augmentent d'une façon modeste (<3 fois) le taux de PtdIns3P. C'est le cas de la stimulation des plaquettes par la thrombine ou le CRP. Le maintien d'un taux basal de ce lipide est essentiel pour l'homéostasie cellulaire et en particulier pour le contrôle du trafic intracellulaire. Le PtdIns3P recrute des protéines effectrices possédant un domaine FYVE (Fab1p, YOPB, Vps27p et EEA1) ou PX. Selon sa localisation, le PtdIns3P régule : i) le trafic intracellulaire, dont la fusion endosomale, le recyclage des vésicules à la membrane plasmique ou au trans-golgi et le tri des vésicules jusqu'aux compartiments lysosomaux (Schink et al., 2013) ; ii) la maturation des autophagosomes en recrutant des protéines de la famille des Atg-18 (WIPI 1 et 2) (Proikas-Cezanne et al., 2015) ; iii) l'exocytose des granules d'insuline par un mécanisme non caractérisé (Dominguez et al., 2011) ; iv) l'activation de p40phox, un composant de la NADPH oxydase (Ellson et al., 2006) ; v) la cytokinèse en recrutant au pont intercellulaire la protéine FYVE-HUNDRED au cours de l'étape finale de la division cellulaire (Sagona et al., 2010). Ainsi, le PtdIns3P joue plusieurs rôles mais le mieux caractérisé reste son implication dans le trafic intracellulaire des endosomes précoces ainsi que dans la formation des corps multivésiculaires (Futter et al., 2001; Johnson et al., 2006).

III.2 PtdIns(3,5)P₂

Le PtdIns(3,5)P₂ est un lipide peu abondant dans les cellules mais il joue un rôle important dans l'homéostasie du trafic vésiculaire. Il est formé majoritairement à partir du PtdIns3P par la 5-kinase PIKfyve. Les 3-phosphatases de la famille des myotubularines jouent aussi un rôle essentiel dans le métabolisme du PtdIns(3,5)P₂ en le déphosphorylant pour donner du PtdIns5P. Le PtdIns(3,5)P₂ semble réguler la fission et la fusion endosomale, le transport rétrograde des endosomes du trans-Golgi et le tri des vésicules vers les endosomes tardifs (Rutherford et al., 2006; Zhang et al., 2007; de Lartigue et al., 2009). Ce rôle est dû à son interaction avec des protéines ayant, pour la majorité, un domaine β -propeller (Thumm et al., 2013). Il a également été montré que le récepteur TRPML-1 (transient receptor potential mucolipin 1) qui est présent sur les endosomes tardifs et les lysosomes, lie le PtdIns(3,5)P₂ qui l'active (Li et al., 2013). Enfin, le PtdIns(3,5)P₂ serait capable de moduler la contraction du muscle cardiaque en altérant la concentration de Ca²⁺ intracellulaire (Touchberry et al., 2010). Cependant, il existe actuellement peu

d'outils pour localiser précisément ce lipide (Li et al., 2013) qui est également difficile à doser par des approches biochimiques, ce qui limite son étude.

Les données actuelles suggèrent fortement que le PtdIns3P, le PtdIns5P et le PtdIns(3,5)P₂ ont des voies métaboliques interconnectées et la conversion entre ces lipides pourrait être à la base de la régulation et de la coordination du trafic vésiculaire et de la dynamique du cytosquelette.

III.3 PtdIns5P

Le PtdIns5P a été décrit pour la première fois dans les cellules de mammifères par Rameh *et al.* en 1997 (Rameh et al., 1997a). Il est présent dans les cellules eucaryotes, les plantes, chez *C. elegans* et la drosophile (Meijer et al., 2001; Amoasii et al., 2012; Clarke and Irvine, 2013; Gupta et al., 2013; Jones et al., 2013). On sait aujourd'hui que ce lipide peut être produit par phosphorylation du PtdIns par PIKfyve (Shisheva et al., 2015), déphosphorylation du PtdIns(3,5)P₂ par les myotubularines (Tronchère et al., 2004) ou déphosphorylation du PtdIns(4,5)P₂ par une 4-phosphatase de type II (Ungewickell et al., 2005). Ses voies de dégradation sont mal connues et la seule à être clairement décrite fait intervenir une PtdIns5P 4-kinase de type II qui le transforme en PtdIns(4,5)P₂ (Jones et al., 2006). Le PtdIns5P est localisé dans différents compartiments comme la membrane plasmique, les endosomes, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et le noyau (Jones et al., 2006; Coronas et al., 2007; Sarkes and Rameh, 2010; Boal et al., 2015). Le PtdIns5P est capable de recruter des protéines effectrices par l'intermédiaire de domaines particuliers tel que les domaines PHD (Gozani et al., 2003; Musselman and Kutateladze, 2009) et certains domaines PH (Guittard et al., 2009, 2010). Récemment, notre équipe a montré que la protéine TOM1 est capable de lier le PtdIns5P grâce à son domaine VHS et régule ainsi la maturation des endosomes (Boal et al., 2015) ainsi que la protéine Tiam1 par son domaine PH, ce qui régule la dynamique de l'actine et l'invasion cellulaire (Viaud et al., 2014b).

a) Fonctions du PtdIns5P

Rôle dans la signalisation et le trafic vésiculaire

Une augmentation du taux de PtdIns5P peut être détectée suite à une réponse à différents stimuli, et le rôle de ce lipide dans la signalisation a été démontré dans plusieurs travaux

(pour revue (Viaud et al., 2014a)). En effet, trois études indépendantes ont montré un lien entre la production de PtdIns5P et l'activation de la voie Akt/PKB. Durant les premières phases d'infection par *S. flexneri*, la production du PtdIns5P par la phosphatase bactérienne IpgD au foyer d'entrée du pathogène (Niebuhr et al., 2002) induit une activation de la voie Akt, un mécanisme qui favorise la survie de la cellule hôte au profit du pathogène (Pendaries et al., 2006). La surexpression de la PtdIns5P 4-kinase, qui diminue le taux de PtdIns5P en le transformant en PtdIns(4,5)P₂, induit quant à elle une diminution de l'activation d'Akt stimulée par l'insuline (Carricaburu et al., 2003). Enfin, la délétion de la PtdIns5P 4-kinase chez la souris améliore la sensibilité à l'insuline en augmentant l'activation d'Akt dans les muscles (Lamia et al., 2004). Les mécanismes sous-jacents sont encore assez mal compris mais dans le cas *S. flexneri* ils font appel à une activation de l'EGFR indépendamment de son ligand qui est rapidement endocytosé et bloqué dans les endosomes précoces où il envoie des signaux de survie de façon très prolongée (Ramel et al., 2011). La production du PtdIns5P induite lors de l'infection par *S. flexneri* ralentit la dégradation de l'EGFR en altérant le trafic des protéines cargo des endosomes vers les lysosomes. Nous avons récemment montré que ce ralentissement de la voie de dégradation est due au recrutement de la protéine adaptatrice TOM-1 sur les endosomes par le PtdIns5P (Boal et al., 2015). Ces résultats sont en accord avec une étude phylogénétique qui a montré une co-évolution des protéines impliquées dans le métabolisme du PtdIns5P (PIKfyve, MTM et PtdIns5P 4-kinase) chez les eucaryotes et qui propose un rôle de cette voie métabolique dans la régulation du trafic vésiculaire (Lecompte et al., 2008). Enfin, notre équipe vient de montrer que dans les cellules intestinales infectées par *S. flexneri* le PtdIns5P produit par IpgD entraîne l'internalisation rapide d'ICAM-1 et sa dégradation dans les lysosomes, ce qui réduit le recrutement des neutrophiles et représente une stratégie d'échappement au système immunitaire par la bactérie pathogène (Boal et al., 2016). Dans ces cellules, il est montré que l'EGFR est également internalisé mais se retrouve dans les endosomes précoces alors qu'ICAM-1 est rapidement adressé au compartiment tardif et dans les lysosomes. Ce travail suggère un niveau de régulation complexe par les effecteurs du PtdIns5P qui orientent les voies du trafic intracellulaire de manière très contrôlée en fonction des protéines cargo.

Dans les lymphocytes T, le PtdIns5P est produit d'une façon rapide après l'activation du TCR, et régule la phosphorylation des protéines adaptatrices Dok et leur recrutement en se liant à leur domaine PH (Guittard et al., 2009, 2010).

Enfin, une élévation du taux de PtdIns5P a également été observée dans les plaquettes humaines suite à une stimulation à la thrombine (Morris et al., 2000). Notre équipe a confirmé ces résultats mais le rôle du PtdIns5P dans les plaquettes sanguines reste inconnu.

Rôle dans l'organisation du cytosquelette

Plusieurs études suggèrent que le PtdIns5P a un impact sur la réorganisation du cytosquelette d'actine. Une première observation a révélé que l'infection par *S. flexneri* induit un remodelage du cytosquelette au site d'entrée de la bactérie, une perte des fibres de stress de F-actine et une apparition de bourgeonnements membranaires semblables à ceux qui apparaissent lors de l'activation des petites GTPases de la famille Rho, Cdc42 et Rac1 (Niebuhr et al., 2002). Cependant, il était difficile de démontrer que cet effet était dû au PtdIns5P, puisqu'IpgD diminue également le taux du PtdIns(4,5)P₂, un lipide connu pour son rôle dans la régulation du cytosquelette. De plus, la bactérie injecte d'autres facteurs qui agissent sur le cytosquelette. Des études ont montré que la stimulation par l'insuline des adipocyte 3T3-L1 entraîne un remodelage du cytosquelette d'actine caractérisé par une dissociation des fibres de stress de F-actine concomitante à la production de PtdIns5P dépendante de PIKfyve (Sbrissa et al., 1999, 2004b, 2012). De plus, l'expression de la sonde EGFP-3xPHD_{ING2}, qui lie et piège le PtdIns5P bloque cet effet (Sbrissa et al., 2004b). Cette équipe a montré que ce remodelage d'actine, qui semble dépendant du PtdIns5P, est associé à la translocation des vésicules qui contiennent le transporteur de glucose GLUT4 à la membrane plasmique (Sbrissa et al., 2004b). D'autres travaux ont montré que le PtdIns5P était une molécule importante dans le réarrangement du cytosquelette d'actine et la régulation de la migration cellulaire en réponse au FGF1 dans les cellules de fibroblastes (Haugsten et al., 2013; Oppelt et al., 2013).

Notre équipe a observé la perte des fibres de stress après addition de PtdIns5P exogène perméant mais pas de PtdIns4P ou de PtdIns3P et montré que le PtdIns5P favorise l'invasion cellulaire et la dynamique de la membrane. Ces effets sont en partie médiés par l'activation du système Tiam1/Rac1 via la liaison directe du PtdIns5P au domaine PH de Tiam1 (Viaud et al., 2014b). Ce travail montre également une colocalisation de Tiam1/Rac1 et du PtdIns5P dans des vésicules d'endocytose et des "dorsal ruffles" suggérant que le PtdIns5P pourrait être un régulateur et un coordonnateur du dynamisme de l'actine et du trafic vésiculaire.

Fonctions nucléaires

Des travaux de l'équipe du Dr. Divecha (Jones et al., 2006; Stijf-Bultsma et al., 2015) décrivent un métabolisme et un rôle du PtdIns5P dans le noyau et en effet, la première protéine découverte comme interagissant avec le PtdIns5P est une protéine régulatrice de la chromatine, ING2 (Gozani et al., 2003). Le PtdIns5P pourrait réguler l'activité transcriptionnelle (Stijf-Bultsma et al., 2015) et l'ubiquitination nucléaire de certaines protéines telles que le complexe ubiquitine ligase Cul3 (Jones et al., 2006; Bunce et al., 2008). De plus, le domaine PHD de la sous unité p62 du facteur de transcription TFIID possède une certaine spécificité pour le PtdIns5P bien que l'effet réel de cette association sur la transcription des gènes ne soit pas encore bien connu (Di Lello et al., 2005).

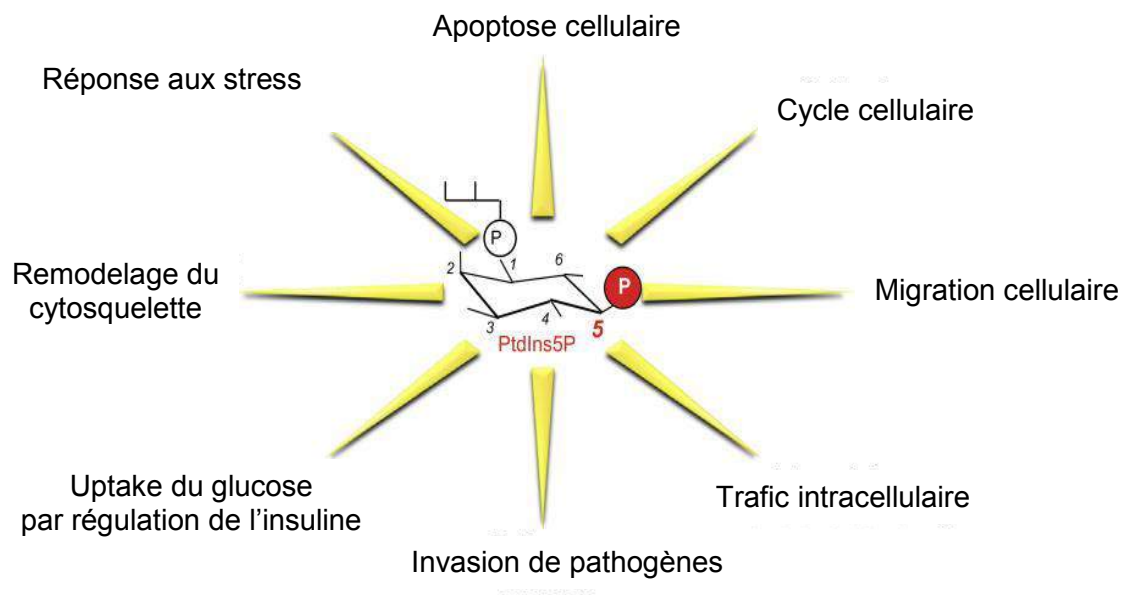


Figure 20 : Différentes fonctions du PtdIns5P (D'après Shisheva 2013)

Objectifs

L'objectif de ma thèse a été de comprendre le rôle du PtdIns5P et des enzymes responsables de sa synthèse dans les mégacaryocytes et les plaquettes. Une première partie de mon étude concerne la lipide phosphatase MTM1, qui génère du PtdIns5P par hydrolyse du PtdIns(3,5)P₂. Ces travaux ont été menés sur des plaquettes humaines et des plaquettes issues d'un modèle murin présentant une invalidation du gène codant pour la protéine MTM1. Dans une seconde partie, je me suis intéressée au rôle du PtdIns5P, produit par la lipide kinase PIKfyve, dans le maintien et l'intégrité des granules plaquettaires. Ces travaux sont basés sur une approche d'inhibition pharmacologique de PIKfyve et de réduction de son expression par siRNA. Plusieurs modèles ont été utilisés: la lignée mégacaryocytaire MEG-01, des mégacaryocytes murins primaires et des plaquettes humaines.

Les résultats obtenus seront décrits dans le chapitre « Résultats expérimentaux » de cette thèse.

Résultats Expérimentaux

Article 1 : Expression des myotubularines dans les plaquettes ; caractérisation et diagnostic potentiel des myopathies myotubulaires

I. Contexte scientifique :

La famille des myotubularines se compose de 14 membres (MTM1 et MTMR1 à MTMR13) plus MTMR14 ou Jumpy. Ces protéines sont des PI 3-phosphatases qui, avec la kinase PIKfyve et les PI3K de classe II et III jouent un rôle important dans le maintien de la balance entre le PtdIns5P, PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P₂. Les myotubularines sont impliquées dans le contrôle de l'endocytose et du trafic membranaire (Ketel et al., 2016; Nicot and Laporte, 2008). D'autres études ont également suggéré un rôle des myotubularines dans la régulation de différents processus comme la prolifération, la survie, l'autophagie, l'organisation du cytosquelette et la dynamique des jonctions cellulaires.

L'expression des différentes myotubularines, ainsi que leur fonction, restent peu étudiées dans les plaquettes. Une première étude a montré qu'un membre inactif « phosphatase dead » de la famille des myotubularines, MTMR12, interagit avec les myotubularines MTM1 et MTMR2 dans les plaquettes (Nandurkar et al., 2001, 2003). De plus, chez des patients ayant une BMTCP (Bengal macrocytopenia), un défaut plaquettaire caractérisé par des diathèses hémorragiques, MTMR9 est l'un des quatre gènes fortement surexprimés (Ali et al., 2015). Enfin, le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P₂, substrats des myotubularines, ainsi que le PtdIns5P son produit, sont présents dans la plaquette mais leurs rôles restent peu connus. Quant au PtdIns3P et au PtdIns5P, plusieurs études montrent que leur taux augmentent suite à une activation plaquettaire (Chicanne et al., 2012; Morris et al., 2000; Zhang et al., 1998).

Plusieurs mutations dans le gène MTM1 sont retrouvées chez des patients atteints de myopathie centronucléaire liée au chromosome X (CNMX). Le diagnostic de cette pathologie grave prend plusieurs jours, voire quelques semaines. Dans la majorité des cas, les mutations se traduisent par une absence de la protéine MTM1. Dans ce travail, j'ai étudié le rôle de MTM1 dans la plaquette et propose la détection de MTM1 à partir d'un volume minimal de sang (100µl) comme diagnostic rapide de CNMX.

Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article suivant.

II. Publication acceptée à BBRC :

Expression of myotubularins in blood platelets; characterization and potential diagnostic of X-linked myotubular myopathy

Rana Mansour, Sonia Severin, Jean-Marie Xuereb, Marie-Pierre Gratacap, Jocelyn Laporte, Anna Bujbelo, Hélène Tronchère, Bernard Payrastre

Biochem Biophys Res Commun. 2016 May 4. pii: S0006-291X(16)30641-6



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Expression of myotubularins in blood platelets: Characterization and potential diagnostic of X-linked myotubular myopathy

Rana Mansour^a, Sonia Severin^a, Jean-Marie Xuereb^a, Marie-Pierre Gratacap^a,
Jocelyn Laporte^b, Ana Buj-Bello^{b,1}, Hélène Tronch ere^{a,**}, Bernard Payrastre^{a,c,*}

^a INSERM, U1048 and Université Toulouse 3, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Toulouse, France

^b Institut de Génétique et Biologie Mol culaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U964, CNRS UMR710, Strasbourg University, Illkirch, France

^c CHU de Toulouse, Laboratoire d'Hématologie, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 April 2016

Accepted 24 April 2016

Available online xxx

Keywords:

Myotubularins

X-linked myotubular myopathy

Blood platelets

Phosphoinositides

Diagnostic

ABSTRACT

Phosphoinositides play a key role in the spatiotemporal control of central intracellular processes and several specific kinases and phosphatases regulating the level of these lipids are implicated in human diseases. Myotubularins are a family of 3-phosphatases acting specifically on phosphatidylinositol 3-monophosphate and phosphatidylinositol 3,5 bisphosphate. Members of this family are mutated in genetic diseases including myotubularin 1 (MTM1) and myotubularin-related protein 2 (MTMR2) which mutations are responsible of X-linked centronuclear myopathy and Charcot-Marie-Tooth neuropathy, respectively. Here we show that MTM1 is expressed in blood platelets and that hundred microliters of blood is sufficient to detect the protein by western blotting. Since the most severe cases of pathogenic mutations of MTM1 lead to loss of expression of the protein, we propose that a minimal amount of blood can allow a rapid diagnostic test of X-linked myotubular myopathy, which is currently based on histopathology of muscle biopsy and molecular genetic testing. In platelets, MTM1 is a highly active 3-phosphatase mainly associated to membranes and found on the dense granules and to a lesser extent on alpha-granules. However, deletion of MTM1 in mouse had no significant effect on platelet count and on platelet secretion and aggregation induced by thrombin or collagen stimulation. Potential compensation by other members of the myotubularin family is conceivable since MTMR2 was easily detectable by western blotting and the mRNA of several members of the family increased during *in vitro* differentiation of human megakaryocytes and MEG-01 cells. In conclusion, we show the presence of several myotubularins in platelets and propose that minimal amounts of blood can be used to develop a rapid diagnostic test for genetic pathologies linked to loss of expression of these phosphatases.

  2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The myotubularin family of proteins is a large group of 14 members in humans (MTM1 and MTMR1 to MTMR13) [1]. Mutations in the *MTM1* gene cause X-linked centronuclear myopathy while mutations in the *MTMR2* and *MTMR13* genes cause two forms of Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT), CMT4B1 and CMT4B2,

respectively [1–3]. This family of proteins encompasses both catalytically active (MTM1, MTMR1, MTMR2, MTMR3, MTMR4, MTMR6, MTMR7, MTMR8) and inactive (MTMR5, MTMR9, MTMR10, MTMR11, MTMR12, MTMR13) phosphatases. The enzymatically active ones have a C(X)5R signature motif in the catalytic domain and act as 3-phosphatases with a substrate specificity toward two phosphoinositides, phosphatidylinositol 3-monophosphate (PtdIns3P) and phosphatidylinositol 3,5 bisphosphate (PtdIns(3,5)P₂) [4,5]. Thus, active myotubularins transform PtdIns3P into PtdIns and PtdIns(3,5)P₂ into PtdIns5P. Several inactive myotubularin members have been shown to heterodimerize with active ones with selective pairs being formed [6]. These interactions are thought to modulate the phosphatase activity and the localization of active myotubularins [1,6]. For instance, MTMR2 and MTMR13 have been shown to interact and both of them are

* Corresponding author. Inserm U1048, I2MC, 1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 04, France.

** Corresponding author. Inserm U1048, I2MC, 1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 04, France.

E-mail addresses: helene.tronchere@inserm.fr (H. Tronchère), bernard.payrastre@inserm.fr (B. Payrastre).

¹ Present address: G en thon, INSERM UMR 951, Evry, France.

mutated in Charcot-Marie-Tooth neuropathies [7,8]. Together with class II and class III phosphoinositide 3-kinases and PIKfyve, the active myotubularins regulate the turnover of PtdIns3P and PtdIns(3,5)P₂, two lipids involved in the control of intracellular vesicle trafficking. Accordingly, several reports have highlighted the role of myotubularins in endocytosis and membrane trafficking [9–11]. Other reports also suggest a role of myotubularins in the regulation of various processes including cell proliferation, survival, autophagy, cytoskeleton organization and cell junction dynamics [1].

The pattern of expression and the function of myotubularins in blood platelets remain poorly known. However, using blood platelet extracts, Nandurkar and colleagues [12,13] have been able to show that the inactive member MTMR12 interacts with the active myotubularins MTM1 and MTMR2. Moreover, *MTMR9* which encodes an inactive myotubularin, was found differentially expressed in platelets from patients with Bengal macrothrombocytopenia, a giant platelet disorder characterized by mild bleeding symptoms [14]. Despite the presence of myotubularin substrates (PtdIns3P, PtdIns(3,5)P₂) and products (PtdIns, PtdIns5P) in platelets, little is known about their cellular roles. Indeed, PtdIns3P is found in resting platelets and its amount increases following platelet activation [15,16]. PtdIns(3,5)P₂ is weakly detectable by HPLC techniques in ³²P-labelled platelets (B.P. personal observation) and PtdIns5P has been shown to increase following platelet activation [17]. Here, we clearly show the expression of MTM1 as an active 3-phosphatase in blood platelets and highlight the relevance to develop, from a minimal amount of blood, a rapid diagnostic test for X-linked myotubular myopathy. Deficiency of MTM1 in mice platelets has however no significant impact on platelet production or platelet secretion and aggregation in response to thrombin or collagen. Potential redundancy mechanism involving other myotubularins is conceivable since the level of mRNA of several members of the family significantly increases during *in vitro* megakaryocyte differentiation.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The anti-human MTM1 antibodies (1G6 and 1947) were generated as described [18–21]. The anti-MTMR2 antibody was a gift from Dr A. Bolino (Istituto Scientifico San Raffaele, Milano). The other antibodies used in this study are as follow: anti-Hsc70, serotonin, von Willebrand Factor (vWF) and LAMP2 (Santa Cruz), EEA1 (BD Biosciences). Fluorescent di-C8-NBD-PtdIns3P and di-C8-NBD-PtdIns(3,5)P₂ were from Echelon Research Laboratories. All other reagents were purchased from Sigma–Aldrich unless otherwise indicated.

2.2. Preparation of human platelets and fractionation

Blood from healthy donors was purchased from the Etablissement Français du Sang (Toulouse) and immediately processed for platelet experiments. Washed platelets were isolated by successive centrifugation steps and analyzed by western blotting as previously described [22]. Light transmission aggregometry, secretion and immunofluorescence studies are described in the [supplemental materials and methods](#).

For subcellular fractionation, platelets were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) and sonicated. After a 5 min centrifugation at 2000× g, the supernatant was centrifuged at 20,000× g for 1 h. The supernatant (cytosol fraction) was collected and the pellet (membrane fraction) was resuspended in an equivalent volume of lysis buffer. The

cytoskeleton fraction was isolated as previously described [23].

2.3. Preparation of murine platelets

C57Bl/6 wild type or MTM1 knockout mice (KO) [24,25] used in the study were housed in the U1048-Toulouse Ranguel animal facility according to the guidelines of the Ethics Committee on Animal Experimentation and with the French Ministry of Agriculture license (<http://anexplo.genotoul.fr>). Whole blood was drawn from the inferior vena cava of anesthetized 8–20 week-old mice into a syringe containing acid citrate dextrose (1:9 v/v). Mouse platelets were then prepared as previously described [26].

2.4. MTM1 immunoprecipitation and 3-phosphatase assay

MTM1 was immunoprecipitated using 1.2 μl 1G6 antibody and the 3-phosphatase assay was performed as previously described [27].

2.5. Preparation and differentiation of human megakaryocytes and MEG-01 cells

CD34 cells were separated from leukapheresis using a magnetic cell sorting system (Miltenyi Biotec) in accordance with the manufacturer's recommendations and differentiation was performed as described in the [supplemental materials and methods](#). The human megakaryocytic MEG-01 cells were cultured with Glutamax RPMI medium 1640 supplemented with fetal calf serum (FCS) and penicillin/streptomycin and differentiated with 2 mM valproic acid for 5 days as indicated [28]. Total RNA from cells, either differentiated or not, was prepared using the GeneElute Total RNA Mammalian kit from Sigma and quantified using a Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Reverse-transcription was performed as described in the [supplemental materials and methods](#).

2.6. Statistical analysis

Data are presented as the mean ± SEM of at least three independent experiments. Statistical significance was analyzed using unpaired Student's *t*-test using Microsoft Excel 2007. Significance was set when *p* < 0.05.

3. Results

3.1. Immuno-detection and activity of MTM1 in blood platelets

Since the majority of MTM1 mutations in X-linked myotubular myopathy lead to a loss of expression of this protein [29,30] it could be relevant to develop a rapid diagnostic test from a low amount of blood. Indeed, the diagnostic of X-linked myotubular myopathy is currently based on histopathology of muscle biopsy and molecular genetic testing which can take up to several weeks to complete. Therefore we first tested whether MTM1 was expressed in blood platelets. As shown in [Fig. 1A](#), MTM1 was weakly detected by western blotting in 10⁷ washed human platelets and strongly detected in 5 × 10⁷ platelets. The level of MTM1 appeared constants from one donor to another since similar results were observed in platelets from 5 different healthy donors (not shown). To unambiguously prove that this protein was MTM1, the same antibody was used to immunoprecipitate the protein from human platelets and test its 3-phosphatase activity. Platelet MTM1 was indeed active as it could efficiently transform 1 nmol of PtdIns3P into PtdIns and 1 nmol of PtdIns(3,5)P₂ into PtdIns5P within 20 min ([Fig. 1B](#)). It was also highly selective since no activity against the other phosphoinositides could be detected (not shown). These

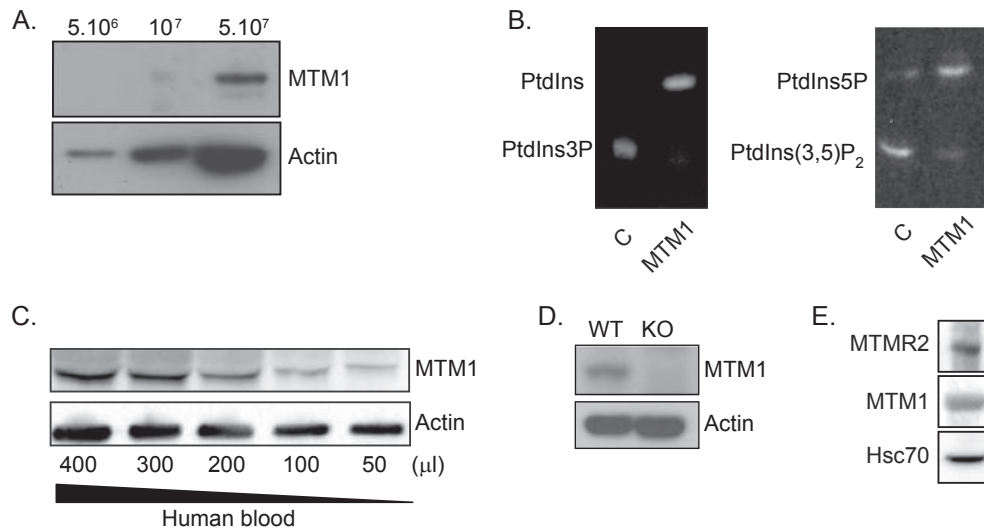


Fig. 1. Detection and enzymatic activity of MTM1 in platelets. (A) Increasing amounts of washed human platelets were analyzed by western blotting using the specific 1G6 MTM1 antibody. Actin is used as a loading control. (B) MTM1 was immunoprecipitated from human platelets with the 1G6 antibody followed by phosphatase assay against fluorescent PtdIns3P and PtdIns(3,5)P₂. The enzymatic reaction (transformation of PtdIns3P and PtdIns(3,5)P₂ into PtdIns and PtdIns5P, respectively) was visualized by thin layer chromatography. (C) Increasing amount of human blood (50–400 μ l) was used to prepare the platelet- and leucocyte-rich plasma. After centrifugation, the cell pellet was analyzed by western blotting using the MTM1 antibody (1947). Actin is used as a loading control. (D) Platelets from wild type or MTM1 KO mice were analyzed by western blotting using the 1G6 MTM1 antibody. Actin is used as a loading control. (E) Washed human platelets were analyzed by western blotting using MTM1, MTMR2 and Hsc70 antibodies as a loading control. Results shown are representative of three to four independent experiments.

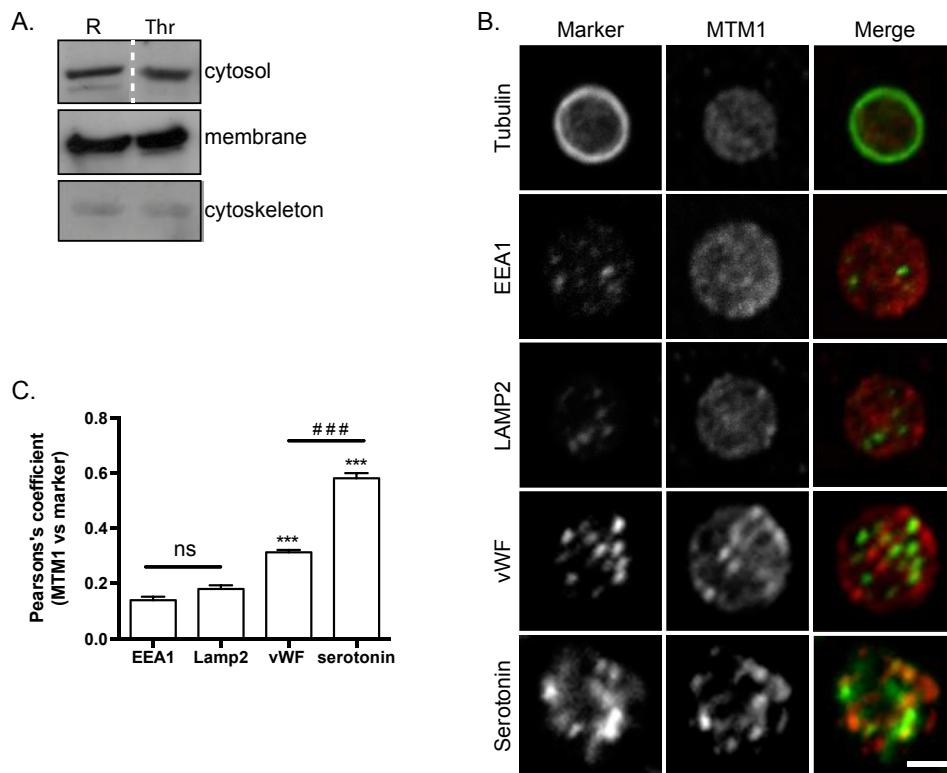


Fig. 2. Localization of MTM1 in human platelets. (A) Washed human platelets were not stimulated (R) or stimulated with 0.5 U/ml of thrombin (Thr) for 5 min. Cytoskeleton, membranes and cytosol fractions isolated from resting or stimulated human platelets were probed for MTM1 and showed enrichment of MTM1 in the membrane fraction. Dashed bar indicates that the blot was skipped. (B) Resting human platelets were fixed, permeabilized and incubated with the MTM1 antibody (1947) and relevant markers antibodies including β -tubulin for microtubule, EEA1 for early endosomes, LAMP2 for late endosomes and lysosomes, serotonin for dense granules and vWF for α -granules. After incubation with Alexa-488 or Alexa-555 conjugated secondary antibodies platelets were visualized with a 63x objective and confocal microscopy (scale bar: 1 μ m). (C) Histograms show the Pearson's coefficient indicating the degree of co-localization of MTM1 with the different markers. Results shown are representative of 3 independent experiments (A and B) and are mean values \pm SEM from three (C, histograms) experiments. Significant differences: ### and *** means $p < 0.001$.

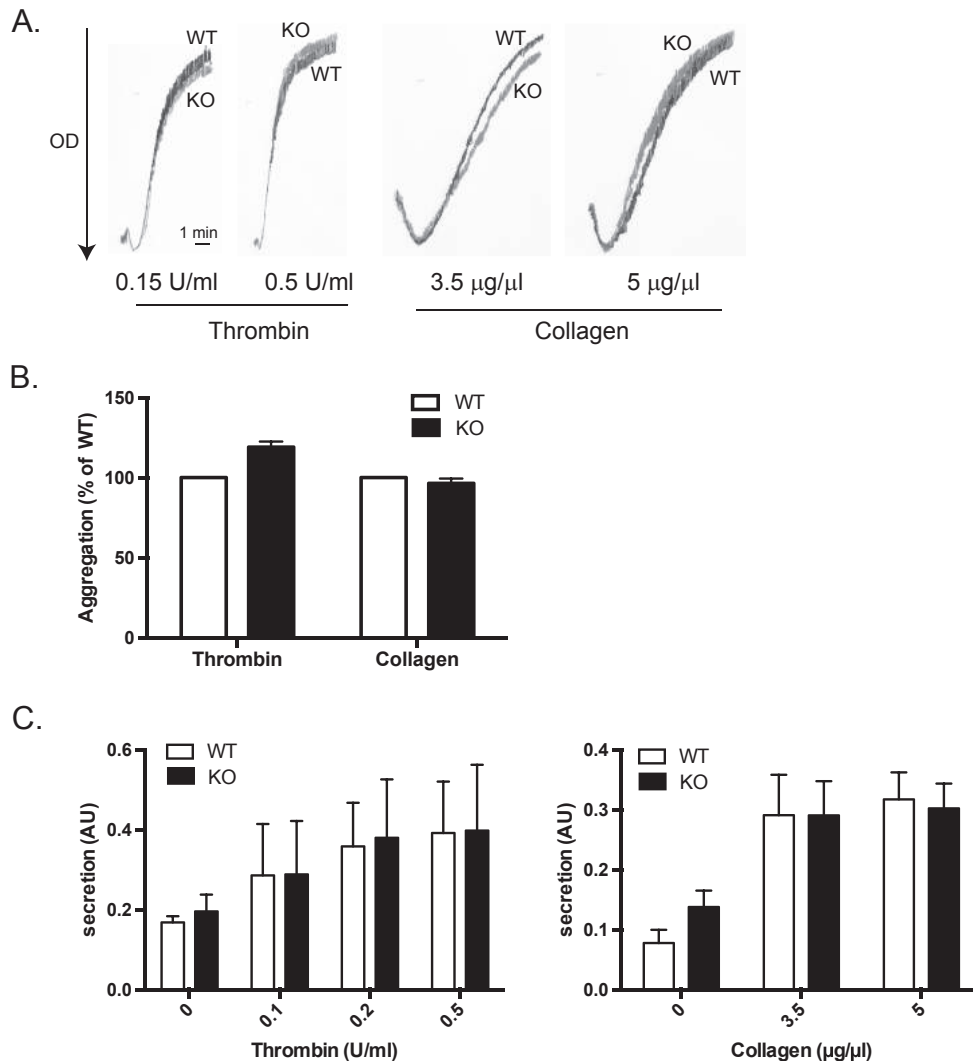


Fig. 3. MTM1 is not required for platelet aggregation following thrombin or collagen stimulation. (A) Washed platelets from wild type (WT) or MTM1 KO (KO) mice were stimulated with different doses of thrombin or collagen and platelet aggregation was assessed using a Chrono-log dual channel aggregometer under stirring at 1000 rev/minutes. Representative aggregation curves (A) and quantification of the aggregation response (B) are shown. (C) Platelets were incubated with [³H]-hydroxy-tryptamine, washed, and the secretion was measured after stimulation with thrombin or collagen by counting radioactivity in the supernatant. Results shown are expressed as mean \pm SEM from 3 independent experiments (A and B) and 2 independent experiments (C).

results indicate that an active MTM1 protein is expressed in human blood platelets.

Interestingly, 50–100 μ l of blood from healthy donors was sufficient to detect MTM1 by western blotting (Fig. 1C). Cell pellet from platelet- and leukocyte-rich plasma, which can be prepared in any laboratory since a basic centrifuge is required, was used in this experiment. MTM1 KO mice are known to develop a myotubular myopathy characterized by a strong muscle atrophy leading to death around 7–9 weeks of age [24,25]. Blood was drawn from 2 weeks old KO and wild type mice and platelets were isolated and tested for MTM1 expression by western blotting. MTM1 was clearly detected from 5×10^7 wild type mice platelets and, as expected, was absent in the same amount of platelets from KO mice indicating the validity of the approach (Fig. 1D). Interestingly, the polyclonal antibody (1947) was able to detect MTM1 by immunofluorescence on washed human platelets (see Fig. 2B) suggesting that this approach could be used to complete the diagnostic. Moreover, we could also detect MTMR2, a close MTM1 homolog in the family (65% sequence identity), in human platelets by western

blotting suggesting that a similar diagnostic test could be applied for Charcot-Marie-Tooth neuropathy (Fig. 1E).

Then we investigated the localization of MTM1 in blood platelets. We first performed cell fractionation experiments and showed that MTM1 was mainly present in the membrane fraction and to a lesser extent in the cytosolic fraction of human platelets either stimulated or not with thrombin (Fig. 2A). MTM1 was weakly detected in the actin cytoskeleton fraction isolated from resting or thrombin-activated platelets. Furthermore, using immunofluorescence we could show that MTM1 does not colocalized with microtubules or early (EEA1) and late (LAMP2) endosomes. However, we found a significant colocalization between MTM1 and the α -granule marker (vWF) and mainly with the dense granule marker (serotonin) (Fig. 2B–C).

3.2. Deletion of MTM1 does not affect platelet aggregation following thrombin or collagen activation

MTM1 KO mice exhibited a normal platelet count

($8.4 \pm 0.8 \times 10^8$ /ml of blood for wild type mice and $8.9 \pm 0.5 \times 10^8$ /ml of blood for KO mice, $n = 3$) indicating that MTM1 is not required for platelet production. To further address the impact of MTM1 on platelet function we tested the aggregation response of platelets from wild type and KO mice following stimulation with the physiological agonists thrombin and collagen. We could not see any significant alteration in the aggregation response of KO platelets following stimulation with high or low doses of agonists (Fig. 3A–B). Moreover, the secretion of dense granules measured by a serotonin release assay was not affected in KO platelets in response to increasing doses of thrombin or collagen suggesting that other myotubularins could compensate for MTM1 absence in platelets (Fig. 3C).

3.3. Increased levels of various myotubularins mRNA during human megakaryocytes and MEG-01 cells differentiation

As shown in Fig. 1E, MTMR2 is also expressed in human platelets. To check whether other members of this family would be expressed as well, we monitored mRNA level of 12 myotubularins by RT-QPCR in human megakaryocytes and in the megakaryocytic cell line MEG-01 before and after differentiation (Fig. 4). Human hematopoietic progenitors were differentiated into mature

megakaryocytes by a mixture of TPO and SCF during 14 days while MEG-01 cells were differentiated into megakaryocytes by valproic acid during 5 days [28]. Interestingly, compared to the house-keeping gene HSP70 that remained stable, the transcript level of major enzymatically active myotubularin family members and homolog (MTMR14 also called Jumpy) significantly increased during differentiation of normal human megakaryocytes (2.26 fold for MTM1, 2.03 for MTMR1, 2.79 for MTMR2, 2.02 for MTMR3, 2.32 for MTMR4, 2.07 for MTMR6, 1.79 for MTMR7, 2.18 for MTMR8, 2.36 for MTMR14) (Fig. 4A). In similar but not identical configuration, several active myotubularins are also significantly transcriptionally increased in differentiated MEG-01 cells (MTM1, MTMR7, MTMR8, MTMR14) (Fig. 4B). The transcript level of certain phosphatase-dead myotubularins also increased in both cell models. Overall, these data suggest that several enzymatically active myotubularins are expressed in megakaryocytes and platelets leaving open potential redundancy mechanisms within the myotubularin family in megakaryocytes and platelets.

4. Discussion

X-linked myotubular myopathy is the most common form of a group of myopathies termed centronuclear myopathies. The diagnostic of X-linked myotubular myopathy relies upon histopathology of muscle biopsy and molecular genetic testing [31] which is invasive and time consuming. In addition, individuals with centronuclear myopathies, related or not to *MTM1* mutations, or with congenital myotonic dystrophy share common muscle biopsy features, particularly the presence of central nuclei in affected skeletal muscle. The molecular genetic testing is essential for the definitive diagnosis which leads to uncover more than 200 loss of function mutations widespread throughout the *MTM1* gene, most of them being missense, frameshift or nonsense mutations [29,32]. Interestingly, most patients with *MTM1* mutations have a strong decrease or an absence of MTM1 as shown in established cell lines and muscle biopsies [30,33]. Thus, a rapid diagnostic test using a minimal amount of blood, harvestable in a newborn, to check for the expression of MTM1 would be useful to aid a rapid diagnosis of X-linked myotubular myopathy that is key for parents counseling and health care. Here we show that blood platelets express a sufficient amount of MTM1 to be used in blood sample-based diagnostic test. Indeed, one hundred microliters of blood, is sufficient to detect MTM1 by western blotting in platelet- and leukocyte-rich fraction. Unfortunately, using currently available MTM1 antibodies we were unable to develop a flow cytometry-based method to detect the protein in whole blood or platelet rich plasma. Development of new antibodies against MTM1 may allow to set up this type of flow cytometry method which would be very convenient as it is rapid, uses minimal amount of blood and is available in most hospital laboratories. Since MTMR2 is also expressed in platelets the diagnostic test could be extended to other myotubularin-related diseases [34].

While we found most myotubularins present in megakaryocytes, their role in these cells and in platelets remains unknown. We found that platelet MTM1 is a highly active 3-phosphatase able to selectively hydrolyze PtdIns3P and PtdIns(3,5)P₂ *in vitro*. It was mainly present in the isolated membrane fraction and co-localized with a α -granule marker, and mainly with a dense granule marker. However, our data show that MTM1 is dispensable for platelet production, as no thrombocytopenia was noted in MTM1 KO mice and for platelet function, as no aggregation and secretion dysfunctions could be observed following thrombin or collagen stimulation. This is consistent with the fact that no bleeding diathesis has been reported in X-linked myotubular myopathy patients and suggested that other myotubularins could compensate to MTM1

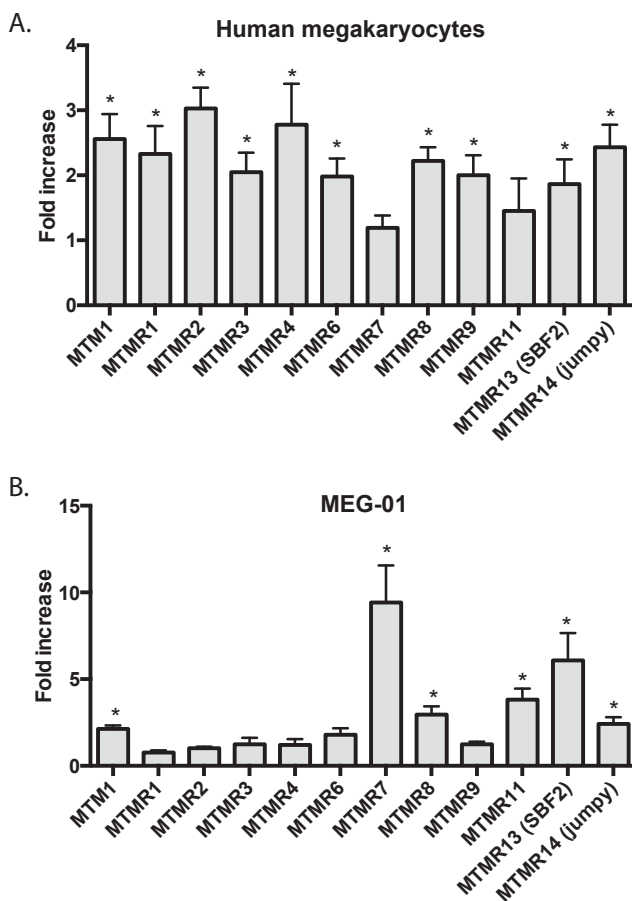


Fig. 4. Myotubularins transcript during megakaryocytes differentiation. The mRNA level of different members of the myotubularin family was quantified and normalized against *HSP70* mRNA expression which was stable in (A) human hematopoietic progenitors differentiated to megakaryocytes in the presence of TPO or (B) the megakaryocytic cell line MEG-01 cells differentiated in the presence of valproic acid. The $\Delta\Delta\text{CT}$ method was used to calculate the fold change in gene expression. Results shown are expressed as mean \pm SEM of at least 3 independent experiments. Significant differences: * $p < 0.05$.

deficiency [35].

Indeed, the mRNA level of several members of the myotubularin family increased during *in vitro* differentiation of human hematopoietic progenitors into megakaryocytes as well as following differentiation of the human megakaryoblastic MEG-01 cell line with valproic acid [28]. Functional redundancy mechanisms have been described in zebrafish where the skeletal muscle phenotype of the *mtm1* morphants was rescued by delivery of MTMR1 or MTMR2 [36].

In conclusion, our data show the presence of MTM1 and MTMR2 in human platelets and suggest that minimal amounts of blood can be used to develop a rapid diagnostic test for genetic pathologies linked to loss of expression of these lipid phosphatases. We also show that MTM1 is dispensable for platelet production and function and that other active myotubularins could compensate for MTM1 loss in megakaryocytes and platelets.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to report.

Acknowledgments

The authors thank the Animal Core Facility UMS US006/Inserm of anexplo-Genotoul and the Cellular Imaging Facility of Inserm UMR1048, Karim Hnia for helpful discussions, Christine Kretz for technical assistance, and Alessandra Bolino for the gift of MTRM2 antibodies.

This work was supported by Inserm and ANR (ANR-13-BSV2-0004-01/03) and E-rare (11-040). R.M. is a fellow of the Société Française d'Hématologie. A.B.-B. is supported by the AFM-Téléthon, France. B.P. is a scholar of the Institut Universitaire de France.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.127>.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.127>.

References

- [1] K. Hnia, I. Vaccari, A. Bolino, J. Laporte, Myotubularin phosphoinositide phosphatases: cellular functions and disease pathophysiology, *Trends Mol. Med.* 18 (2012) 317–327.
- [2] H. Tronchère, A. Bolino, J. Laporte, B. Payrastre, Myotubularins and associated neuromuscular diseases, *Clin. Lipidol.* 7 (2012) 151–162.
- [3] B.S. Cowling, A. Toussaint, J. Muller, J. Laporte, Defective membrane remodeling in neuromuscular diseases: insights from animal models, *PLoS Genet.* 8 (2012) e1002595.
- [4] F.L. Robinson, J.E. Dixon, Myotubularin phosphatases: policing 3-phosphoinositides, *Trends Cell Biol.* 16 (2006) 403–412.
- [5] H. Tronchère, J. Laporte, C. Pendaries, C. Chaussade, B. Payrastre, Production of phosphatidylinositol 5-monophosphate by the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 7304–7312.
- [6] O. Lorenzo, S. Urbé, M.J. Clague, Systematic analysis of myotubularins: heteromeric interactions, subcellular localisation and endosome related functions, *J. Cell. Sci.* 119 (2006) 2953–2959.
- [7] A. Bolino, M. Muglia, F.L. Conforti, E. LeGuern, M.A. Salih, D.M. Georgiou, K. Christodoulou, I. Hausmanowa-Petrusewicz, P. Mandich, A. Schenone, A. Gambardella, F. Bono, A. Quattrone, M. Devoto, A.P. Monaco, Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2, *Nat. Genet.* 25 (2000) 17–19.
- [8] H. Azzedine, A. Bolino, T. Taïeb, N. Birouk, M. Di Duca, A. Bouhouche, S. Benamou, A. Mrabet, T. Hammadouche, T. Chkili, R. Gouider, R. Ravazzolo, A. Brice, J. Laporte, E. LeGuern, 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, *Am. J. Hum. Genet.* 72 (2003) 1141–1153.
- [9] A.S. Nicot, J. Laporte, Endosomal phosphoinositides and human diseases, *Traffic* 9 (2008) 1240–1249.
- [10] Y. Xue, H. Fares, B. Grant, Z. Li, A.M. Rose, S.G. Clark, E.Y. Skolnik, Genetic analysis of the myotubularin family of phosphatases in *Caenorhabditis elegans*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 34380–34386.
- [11] K. Ketel, M. Krauss, A.S. Nicot, D. Puchkov, M. Wieffer, R. Müller, D. Subramanian, C. Schultz, J. Laporte, V. Haucke, A phosphoinositide conversion mechanism for exit from endosomes, *Nature* 529 (2016) 866–8665.
- [12] H.H. Nandurkar, K.K. Caldwell, J.C. Whisstock, M.J. Layton, E.A. Gaudet, F.A. Norris, P.W. Majerus, C.A. Mitchell, Characterization of an adapter subunit to a phosphatidylinositol (3)P 3-phosphatase: identification of a myotubularin-related protein lacking catalytic activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 9499–9504.
- [13] H.H. Nandurkar, M.J. Layton, J. Laporte, C. Selan, L. Corcoran, K.K. Caldwell, Y. Mochizuki, P.W. Majerus, C.A. Mitchell, 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 (2003) 8660–8665.
- [14] S. Ali, K. Ghosh, S. Shetty, Differential expression of genes involved in Bengal macrothrombocytopenia (BMTCP), *Blood Cells Mol. Dis.* 55 (2015) 410–414.
- [15] J. Zhang, H. Banfic, F. Straforini, L. Tosi, S. Volinia, S.E. Rittenhouse, A type II phosphoinositide 3-kinase is stimulated via activated integrin in platelets. A source of phosphatidylinositol 3 monophosphate, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14081–14084.
- [16] G. Chicanne, S. Severin, C. Boscheron, A.D. Terrisse, M.P. Gratacap, F. Gaits-iacovoni, H. Tronchère, B. Payrastre, A novel mass assay to quantify the bioactive lipid PtdIns3P in various biological samples, *Biochem. J.* 447 (2012) 17–23.
- [17] J.B. Morris, K.A. Hinchliffe, A. Ciruela, A.J. Letcher, R.F. Irvine, Thrombin stimulation of platelets causes an increase in phosphatidylinositol 5-phosphate revealed by mass assay, *FEBS Lett.* 475 (2000) 47–60.
- [18] J. Laporte, F. Blondeau, A. Gansmuller, Y. Lutz, J.L. Vonesch, J.L. Mandel, The PtdIns3P phosphatase myotubularin is a cytoplasmic protein that also localizes to Rac1-inducible plasma membrane ruffles, *J. Cell. Sci.* 115 (2002) 3105–3117.
- [19] L. Amoasii, K. Hnia, G. Chicanne, A. Brech, B.S. Cowling, M.M. Müller, Y. Schwab, P. Koebel, A. Ferry, B. Payrastre, J. Laporte, Myotubularin and PtdIns3P remodel the sarcoplasmic reticulum in muscle *in vivo*, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 1806–1819.
- [20] J. Laporte, F. Blondeau, A. Gansmuller, Y. Lutz, J.L. Vonesch, J.L. Mandel, The PtdIns3P phosphatase myotubularin is a cytoplasmic protein that also localizes to Rac1-inducible plasma membrane ruffles, *J. Cell. Sci.* 115 (2002) 3105–3117.
- [21] A. Buj-Bello, F. Fougerousse, Y. Schwab, N. Messaddeq, D. Spohner, C.R. Pierson, M. Durand, C. Kretz, O. Danos, A.M. Douar, A.H. Beggs, P. Schultz, M. Montus, P. Denèfle, J.L. Mandel, 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 (2008) 2132–2143.
- [22] M. Levade, E. David, C. Garcia, P.A. Laurent, S. Cadot, A.S. Michallet, J.C. Bordet, C. Tam, P. Sié, L. Ysebaert, B. Payrastre, Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions, *Blood* 124 (2014) 3991–3995.
- [23] S. Bodin, C. Soulet, H. Tronchère, P. Sié, C. Gachet, M. Plantavid, B. Payrastre, Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets, *J. Cell. Sci.* 118 (2005) 759–769.
- [24] A. Buj-Bello, V. Laugel, N. Messaddeq, H. Zahreddine, J. Laporte, J.F. Pellissier, J.L. Mandel, The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 15060–15065.
- [25] L. Al-Ousairi, N. Weiss, A. Toussaint, C. Berbey, N. Messaddeq, C. Kretz, D. Sanoudou, A.H. Beggs, B. Allard, J.L. Mandel, J. Laporte, V. Jacquemond, A. Buj-Bello, T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 18763–18768.
- [26] C. Valet, G. Chicanne, C. Severac, C. Chaussade, M.A. Whitehead, C. Cabou, M.P. Gratacap, F. Gaits-iacovoni, B. Vanhaesebroeck, B. Payrastre, S. Severin, Essential role of class II PI3K-C2a in platelet membrane morphology, *Blood* 126 (2015) 1128–1137.
- [27] H.M. Rohde, H. Tronchère, B. Payrastre, J. Laporte, Detection of myotubularin phosphatases activity on phosphoinositides *in vitro* and *ex vivo*, *Methods Mol. Biol.* 462 (2009) 265–278.
- [28] N. Schweinfurth, S. Hohmann, M. Deuschle, F. Lederbogen, P. Schloss, Valproic acid and all trans retinoic acid differentially induce megakaryopoiesis and platelet-like particle formation from the megakaryoblastic cell line MEG-01, *Platelets* 21 (2010) 648–657.
- [29] J. Laporte, V. Biancalana, S.M. Tanner, W. Kress, V. Schneider, C. Wallgren-Pettersson, F. Herger, A. Buj-Bello, F. Blondeau, S. Liechti-Gallati, J.L. Mandel, MTM1 Mutations in X-linked myotubular myopathy, *Hum. Mutat.* 15 (2000) 393–409.
- [30] J. Laporte, W. Kress, J.L. Mandel, Diagnosis of X-linked myotubular myopathy by detection of myotubularin, *Ann. Neurol.* 50 (2001) 42–46.
- [31] V. Biancalana, O. Caron, S. Gallati, F. Baas, W. Kress, G. Novelli, M.R. D'Apice, C. Lagier-Tourenne, A. Buj-Bello, N.B. Romero, J.L. Mandel, Characterisation of

- mutations in 77 patients with X-linked myotubular myopathy, including a family with a very mild phenotype, *Hum. Genet.* 112 (2003) 135–142.
- [32] S. Das, J. Dowling, C.R. Pierson, X-linked Centronuclear Myopathy. *GeneReviews*[®], University of Washington, Seattle, Seattle (WA), 2002, pp. 1993–2016.
- [33] V. Tosch, N. Vasli, C. Kretz, A.S. Nicot, C. Gasnier, N. Dondaine, D. Oriot, M. Barth, H. Puissant, N.B. Romero, C.G. Bönnemann, B. Heller, G. Duval, V. Biancalana, J. Laporte, Novel molecular diagnostic approaches for X-linked centronuclear (myotubular) myopathy reveal intronic mutations, *Neuromuscul. Disord.* 20 (2010) 375–381.
- [34] A. Bolis, P. Zordan, S. Coviello, A. Bolino, Myotubularin-related (MTMR) phospholipid phosphatase proteins in the peripheral nervous system, *Mol. Neurobiol.* 35 (2007) 308–316.
- [35] J. Laporte, L. Liaubet, F. Blondeau, H. Tronchère, J.L. Mandel, B. Payrastre, Functional redundancy in the myotubularin family, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291 (2002) 305–312.
- [36] J.J. Dowling, A.P. Vreede, S.E. Low, E.M. Gibbs, J.Y. Kuwada, C.G. Bönnemann, E.L. Feldman, Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy, *PLoS Genet.* 5 (2009) e1000372.

III. Conclusion :

Cette étude nous permet de proposer une technique rapide pour la détection de la protéine MTM1 dans les plaquettes. En effet, en utilisant moins de 100 µl de sang, nous avons pu détecter la protéine MTM1 par immunoblot. Cette technique pourra être appliquée à d'autres membres de la famille des myotubularines mutées dans d'autres maladies génétiques, comme MTMR2, dont la détection par immunoblot est également réalisable. Nous avons déterminé par fractionnement cellulaire, que la protéine MTM1 est présente majoritairement dans la fraction membranaire et faiblement dans le cytosol. Nous avons précisé la localisation de MTM1 par immunofluorescence sur les granules denses. Cependant, du point de vue fonctionnel, MTM1 ne semble pas essentielle dans le contrôle des fonctions plaquettaires. En effet, nous montrons que les souris knockout pour MTM1 ne possèdent aucun défaut plaquettaire. Suite à une stimulation au collagène ou à la thrombine l'agrégation plaquettaire est comparable à celle des souris WT. De même, la sécrétion des granules alpha, mesurée par l'expression de la P-sélectine, n'est pas affectée par l'absence de MTM1. Ceci peut s'expliquer par les mécanismes de redondance des myotubularines. En effet, l'analyse de l'expression des différentes myotubularines augmente au cours de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques humains en mégacaryocytes suggérant la présence de plusieurs myotubularines actives dans les MK et les plaquettes.

Article 2 : Rôle de PIKfyve et du PtdIns5P dans la dynamique et l'intégrité des granules plaquettaires

I. Contexte scientifique :

Les plaquettes jouent un rôle majeur dans l'hémostase en relarguant le contenu de leur granules denses et alpha au site de lésion vasculaire. Les granules denses sont formés à partir des corps multivésiculaires (MVB) (Ambrosio et al., 2012; Youssefian and Cramer, 2000) et les granules alpha à partir du trans-Golgi ainsi que des MVB (Blair and Flaumenhaft, 2009) au niveau des MK. L'analyse des mutations présentes chez des patients présentant des diathèses hémorragiques dues à des défauts granulaires a permis de mettre en évidence l'implication de protéines du trafic vésiculaire dans la biogenèse de ces granules. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la biogenèse et le contrôle de l'identité de ces granules dans les MK restent encore peu définis.

Au cours de ces dernières années les PI sont apparus comme des acteurs majeurs du trafic vésiculaire en tant que régulateurs de la localisation de protéines. Bien que des études récentes aient clarifié les fonctions du PtdIns5P dans les cellules, celui-ci reste l'un des lipides les plus énigmatiques de la famille des PI. Le PtdIns5P est impliqué dans la régulation du trafic vésiculaire ainsi que dans la dynamique du cytosquelette d'actine (Boal et al., 2015, 2016; Viaud et al., 2014b). Il peut être produit par la kinase PIKfyve d'une façon directe à partir du PtdIns ou indirecte en phosphorylant le PtdIns3P en PtdIns(3,5)P₂ qui sera à son tour déphosphorylé en PtdIns5P (Shisheva, 2013). Cependant, dans les MK et les plaquettes le rôle de ce PI ainsi que sa localisation restent inconnus.

Dans ce travail, j'ai étudié le rôle de PIKfyve et de son produit le PtdIns5P dans la régulation de la biogenèse des granules plaquettaires dans une lignée cellulaire leucémique en crise mégacaryoblastique, les MEG-01 et dans les MK primaires. Cette étude nous a permis de montrer l'implication du PtdIns5P tout d'abord dans les mégacaryocytes et ensuite dans le maintien de leur fonction une fois mature dans les plaquettes. Les résultats sont présentés dans l'article suivant.

II. Publication en préparation :

PI5P and PIKfyve control megakaryocyte granule integrity and platelet functions

Rana Mansour, Frédéric Boal, Sonia Severin, Jean-Marie Xuereb, Oxana Kunduzova,
Bernard Payrastre and Hélène Tronchère

Title

PI5P and PIKfyve in the control of megakaryocyte granule integrity and platelet functions

Short title for running head

PI5P and PIKfyve in granule integrity and motility

Authors/Affiliations

Rana Mansour¹, Frédéric Boal¹, Sonia Severin¹, Jean-Marie Xuereb¹, Oxana Kunduzova¹, Bernard Payrastre^{1,4,+} and Hélène Tronchère¹⁺

¹ INSERM U1048, I2MC and Université Paul Sabatier, 31432 Toulouse, France

⁴ CHU de Toulouse, Laboratoire d'Hématologie, 31059 Toulouse Cedex 03, France

+ Corresponding authors: Hélène Tronchère and Bernard Payrastre, Inserm U1048, I2MC, 1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 04, France. Tel.: +335 3122 4149; Fax: +335 6132 5621. E-mail: helene.tronchere@inserm.fr or bernard.payrastre@inserm.fr

E-mail: helene.tronchere@inserm.fr

Abstract

Phosphatidylinositol 5-phosphate (PI5P), one of the last characterized phosphoinositide, has recently emerged as a regulator of vesicular trafficking. However, its function in megakaryocytes and platelets is poorly known. Here we show that PI5P increases during the megakaryocytic MEG-01 cell line maturation and localizes on late vesicular compartments as well as on dense (DG) and alpha (AG) secretory granules. Using the selective PIKfyve inhibitor STA5326, we demonstrate the implication of PIKfyve in the production of a major pool of PI5P in megakaryocytes. We further show that inhibition of PIKfyve induces a reversible loss of AG and DG granule identity in differentiated MEG-01 cells and primary mouse megakaryocytes. Moreover, we show that PIKfyve and microtubules control granules motility. Remarkably, addition of cell permeant PI5P was able to restore both granules identity and motility after STA5326 treatment. Finally, we show that PIKfyve inhibition also affects platelets granule integrity culminating in defects in platelet secretion and thrombus formation under flow. Taken together our data demonstrate that PIKfyve and PI5P control the maintenance of granule identity both in megakaryocytes and platelets.

Introduction

Platelets are known to play a major role in hemostasis and thrombosis. They are rapidly recruited to the site of vascular injuries to prevent bleeding and are now recognized to be key elements in many other physiopathological processes ¹. They are produced from megakaryocytes (MK) in the bone marrow following a long and complex maturation process, involving polyploidy and extensive membrane remodeling ^{2,3}.

Platelets contain specialized secretory compartments: the dense (DG) and the alpha granules (AG) which both contain a number of molecules essential for their functions. DG or AG granules deficiencies have been linked to bleeding disorders in patients, stressing out the importance of granules in hemostasis ⁴⁻⁶. Hermansky-Pudlak syndrome, grey platelet syndrome or arthrogyrosis renal dysfunction and cholestasis (ARC) syndrome are among the best characterized pathologies linked to granule defects. DG concentrates small molecules like ADP, serotonin, calcium and polyphosphates while AG contain cargos proteins like P-selectine, fibrinogen, thrombospondin, Von Willebrand factor and growth factors. DG develops from late endosomes/multivesicular bodies (MVB) during MK maturation, at least in part by receiving newly synthesized membrane proteins through vesicular trafficking ^{7,8}. On the other hand, AG cargos are synthesized in the trans-Golgi network or derived from endocytosis through MVB ^{9,10}. Proteins important for vesicular trafficking have been shown to regulate granules biogenesis, like small G proteins of the Rab family for DG and vesicular proteins for AG ⁸. However, the molecular mechanisms involved in the biogenesis and the control of the identity of these granules in the MK are still poorly known and impede our understanding of granules deficiency in platelets ¹¹.

In recent years, phosphoinositides (PIs) have emerged as key actors in signaling, cytoskeleton remodeling and vesicular trafficking, playing an important role as spatial regulators of many proteins ^{12,13}. The role of the different PIs in MK maturation is still poorly known ¹⁴.

Phosphatidylinositol 5-phosphate (PI5P) remains one of the most enigmatic members of the PIs family due to its low abundance, although recent findings have helped to clarify its function^{15, 16}. Indeed, PI5P has been recently shown to be involved in the regulation of vesicular trafficking and membrane cytoskeleton dynamic¹⁷⁻²⁰. However, the role, localization and metabolic pathway of PI5P are completely unknown in MK and platelets.

How PI5P is produced in cells is still questioned and several routes are proposed. The lipid kinase PIKfyve has been proposed to be a major source of PI5P in mammals¹⁵. This 5-kinase produces PI5P either through the direct phosphorylation of phosphatidylinositol or by a PI3P–PI(3,5)P₂–PI5P route with the concerted action of PIKfyve and the 3-phosphatases of the myotubularin family^{15, 21}. PIKfyve has been involved in the retrograde transport, in the degradative pathway where it facilitates EGFR degradation^{22, 23}, in the trafficking of ion channels²⁴, in GLUT4 mobilisation in adipocytes and muscular cells^{25, 26} and in catecholamine secretion²⁷. PIKfyve also controls matrix metalloproteases secretion and thus migration and invasion in cancer cells^{19, 28}. The discovery of PIKfyve inhibitors, the YM201636 or more recently the more selective STA5326 and APY0201 compounds has helped to decipher the function of PIKfyve in cells^{29, 30}, particularly in inflammation or in endosome maturation in macrophages³⁰⁻³². A clinical trial has been set up to test the effect of STA5326 in the treatment of chronic inflammatory diseases like Crohn disease³³.

Here, we investigated the role of the PIKfyve and its product PI5P in granules maintenance and homeostasis in the megakaryocytic cell line MEG-01 and in primary MK. We show that PI5P is localized on late endocytic compartments and on both AG and DG granules. Inhibition of PIKfyve with STA5326 unraveled a key role of this kinase in the control of the integrity and identity of the DG and AG granules and in their mobility. These results show that maintenance of DG and AG is an active process under the control of PIKfyve and PI5P. We also provide evidences for a role of PIKfyve in platelets granules identity culminating in

defects in platelet secretion and thrombus formation under flow. Altogether our data emphasize a key role for the kinase PIKfyve via the production of PI5P in granules integrity and mobility in MK and platelets.

Methods

Antibodies and reagent

The antibodies used in this study are as follow: anti-HSC-70, anti-PIKfyve, anti-lamp2, anti-PF4, and anti-MRP4 from Santa Cruz Biotech; anti-CD63 from Ab Serotec; anti-CD61-FITC from MACS Milteny Biotech; anti-CD41-PE from Beckman Coulter; anti-VPS34 from Cell signaling; anti-EEA1 from BD Bioscience; anti-Rab7 from Sigma Aldrich. STA5326 was purchased from Axon, mepacrine, fibronectin and valproic acid from Sigma-Aldrich. LysoTracker-Red DND-99, Oregon green fibrinogen, Alexa-594 fibrinogen were purchased from Invitrogen. MTM1 antibody 1947 is a gift of J. Laporte (IGBMC, Illkirch) and MTMR2 is a gift of A. Bolino (Dulbecco Telethon Institute, Milano). CRP was from Pr Richard Farndale laboratory (Cambridge, UK).

Cell culture

MEG-01 cells were obtained from DSMZ and cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.3 µg/mL of Glutamine. Cells were differentiated with $2 \cdot 10^{-3}$ M of valproic acid for 5 days and treated with 200nM STA for 16 hr otherwise stated.

MEG-01 cells were transfected using the Nucleofector electroporation system (Lonza) following manufacturer instructions using the Cell Line Nucleofector Kit C and the X-005 program. For siRNA treatments, two sequential transfections were performed on days 3 and 5 and cells were analyzed on day 6. Oligonucleotides (Ambion) used for siRNA are as follows: Control siRNA 4390843, PIKfyve (Sense : 5'-CCUGGCAUCACAUUUACAUGUUAU-3'; Antisense : 5'-AUAACAUGUAAAUGUGAUGCCAGG-3'). For fluorescent fibrinogen uptake experiments, cells were incubated for 16h at 37°C in medium containing 200 µM Oregon green Fibrinogen or Fibrinogen Alexa Fluor 594 (Invitrogen) with 100 U/ml of refludan from Celgen France. For mepacrine uptake, the dye was added to cells to a final

concentration of 10 μ M followed by a 30min incubation at 37°C and then washed twice with PBS prior to live cell imaging.

In vitro megakaryocytes differentiation

Bone marrow (BM) cells were obtained from femur and tibia of anesthetized C57BL/6 mice by flushing, and lineage depletion was performed using antibodies to CD16/CD32+, Gr1+, B220+ and CD11b+. The remaining cell population was cultured in 2.6% serum-supplemented Stempro medium with 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, 50 mg/mL streptomycin, and 20 ng/mL murine stem cell factor (SCF) at 37°C under 5% CO₂ for 2 days. Cells were then cultured for 3 additional days in the presence of 20 ng/mL SCF and 50 ng/mL of murine TPO. After 3 days of culture in the presence of TPO, the cell population was enriched in mature MKs using a 1.5%-3% bovine serum albumin (BSA) gradient under gravity for 35min at room temperature.

Preparation of platelet from human blood samples and secretion experiments

Blood from healthy donors was purchased from the Etablissement Français du Sang, Toulouse. Platelets were isolated from blood collected under citrate by successive centrifugation steps. Briefly, they were washed in a buffer (pH 6.5) containing 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, 5 mM glucose and 0.35 % bovine serum albumin (BSA) (w/v). The same buffer containing 1 mM CaCl₂ was added to the final suspension, and pH was adjusted to 7.4.

Platelets were stimulated with CRP (0.5 μ g/ml) and secretion was monitored by a turbidimetric method using a dual-channel aggregometer with continuous stirring at 900g at 37°C. ATP secretion was recorded by measuring the luminescence with the Chronolum luciferin-luciferase reagent from Chrono-log (Stago) using the Chrono-log aggregometer (Stago).

Flow assays on collagen matrix

Biochips microcapillaries (Vena8Fluoro+, Cellix) were coated with a collagen fibril suspension (50 $\mu\text{g/ml}$) for 1h and saturated with a solution of 0.5 % BSA. Blood was drawn into heparin (10 IU/ml), and platelets were labeled with DIOC₆ from Life Technologies (2 μM) in whole blood. Using a syringe pump (PHD-2000, Harvard Apparatus), labeled blood was then perfused through a microcapillary for 3min at a wall shear rate of 1500 ou 4000 s^{-1} . Platelet adhesion and thrombus formation was visualized with a 40x oil immersion objective for both fluorescent and transmitted light microscopy and recorded in real time (1 frame every 5 sec) with ORCA Camera (Zeiss). Image sequences of the time lapse recording and analysis of surface coverage were performed offline on single frame by quantification of pixel surface after manual thresholding using ImageJ. Thrombi volumes are calculated by thresholding of surface covered by thrombi on slice of Z-stack images and addition of voxel (automatically converted into μm^3 by Zen® Zeiss software)

Cloning of VMAT2

The cDNAs for VMAT2 was amplified from total RNA of MEG-01 cells by reverse transcriptase-PCR and subsequently cloned in-frame into pEGFP and pmCherry using the following primers: 5'-CGGAATTCTATGGCCCTGAGCGAGCTGGCG-3' and 5'-CGGGATCCTCAGTCACTTTCAGATTCTTCATCTTCACC-3'

Confocal fluorescence microscopy

For live cell imaging, cells were plated on labtek chambers (Nunc) coated with fibronectin (20 mg/ml) and differentiated with $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ valproic acid for 5 days. The samples were imaged using a temperature controlled chamber at 37°C and 5% CO₂ on Zeiss LSM780 confocal fluorescence microscope.

For immunofluorescence experiments, cells were grown on coverslips and fixed 20min at room temperature in 4% paraformaldehyde. After several washes with phosphate-saline buffer (PBS), cells were permeabilized 10min with PBS 1% BSA 0.1% Triton then incubated

with the defined antibody for 1h. Immunofluorescence microscopy samples were examined using the same microscope described above. Fixed and live cell sample images were acquired and analyzed in Fiji and Zen software.

Immunoblotting

For immunoblotting, proteins were resolved on an 8% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose (Millipore). Membranes were then blocked in Tris-buffered saline + 5% BSA for 1 h, incubated with the described primary antibodies and detected with HRP-conjugated secondary antibodies (Promega) and Clarity Western ECL substrate (Biorad) according to the manufacturer's manuals.

Subcellular fractionation

MEG-01 cells ($80 \cdot 10^6$) were washed twice with cold PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ and suspended in 2ml HB (20 mM Hepes 10% sucrose). They were centrifuged at 2000 rpm for 10min and resuspended in 1,5 volume in HB and lysed with 20 strokes using a 22G needle. Cells were then centrifuged at 2000 rpm for 10min and supernatant (PNS) was harvested. Density of PNS was evaluated and adjusted to 10%. The PNS was layered on top of a 10%-60% linear sucrose gradient and centrifuged for 6h at 26000 rpm with a SW-41 rotor. 1 ml Fraction were harvested from the top and stored at -80°C .

Biotinylated GST-2XPHD probe

Production and biotinylation of the recombinant GST protein fused to a tandem of PHD (GST-PHD2x) (Gozani et al, 2003) was as previously described (Coronas, BBRC, 2008). Briefly, GST-PHD2x was produced in BL21 RIL+ bacteria (Stratagene) and biotinylated using the BiotinTag Micro Biotinylation Kit (Sigma-Aldrich).

Washout and recovery experiments with permeant PI5P

MEG-01 cells differentiated with $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ of valproic acid for 5 days were treated overnight with 200 nM of STA5326. For washout experiments cells were then thoroughly washed with

PBS 5 times and mepacrine was added for a 30 min incubation prior to imaging. For PI5P recovery assays, cells were quickly washed and C4-PI5P (Echelon Inc.) at the given concentration in water was added prior live imaging on a Zeiss Axio Observer videomicroscope.

Lipid extraction and PI5P mass assay

Total lipids were extracted according to Blight and Dyer in the presence of HCl to a final concentration of 0.4 N and separated on Silica gel G60 plate in the CH₃Cl/CH₃COOH/NH₃ (9/7/2) solvent system. Monophosphorylated PIs were separated, scraped, eluted from silica, and assayed for PI(4,5)P₂ formation in vitro using the recombinant-specific PI5P 4-kinase type II α and [γ -³²P]ATP (Perkin-Elmer) as described by Morris et al. A standard curve was elaborated in the same conditions with C16-PI5P (Echelon Inc.). [γ -³²P]PI(4,5)P₂ generated was separated by TLC in the above solvent and detected by PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Flow cytometry

Expression levels of CD41 and CD61 were measured by flow cytometry using specific fluorescent coupled antibodies. Samples of suspended cells were run through a cytometer BD Bioscience Fortessa until 10 000 events were collected per condition. Data obtained using flow cytometry was analyzed using Diva software.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the unpaired Student's t-test for comparison between two groups. For multi-group comparison, an ANOVA test was performed followed by a Bonferroni's post-hoc test. Results are presented as mean \pm sem unless otherwise stated and p-values considered significant are indicated in the figure legends.

Results

PI5P increases with differentiation and localizes to late endosomal compartment in MEG-01 cells

The MEG-01 megakaryocytic cell line provides a model system to study primary megakaryocyte (MK) differentiation and functions ^{8, 34, 35}. To induce their differentiation, MEG-01 cells were treated with valproic acid, an HDAC inhibitor as previously described ³⁵. Five days after treatment (D5), the cells displayed “proplatelet-like” elongations (supplemental Figure 1A), concomitantly with an increase in expression level of the typical markers of MK maturation CD41 and CD61 (supplemental Figure 1B). These experimental conditions were therefore used all along this study.

We next quantified PI5P levels in MEG-01 cells by a specific mass assay as previously described ^{21, 36} and observed a significant increase in its level after differentiation (Figure 1A). Consistent with this observation, we observed an increase in the expression of several lipid kinases and phosphatases involved in PI5P production (Figure 1B). A two-fold raise in the expression of the myotubularins MTM1 and MTMR2 and class III PI3-kinase Vps34 and a 3.5-fold increase in the 5-kinase PIKfyve were detected by immunoblotting (Figure 1C-D). Comparable range of increase in the expression of these enzymes at the mRNA level was also measured (supplemental Figure 1C).

The localization of PI5P was then assessed in differentiated MEG-01 cells by confocal microscopy using the PI5P biotinylated GST-2XPHD probe in fixed cells ³⁷ or after transfection of the mCherry-PHD probe in living cells ³⁸. Both tools clearly gave a punctuate localization for PI5P, suggesting that this lipid is localized on vesicular compartments (Figure 1E-F). To further characterize PI5P localization, we performed colocalization studies using mcherry- or GFP- PHD probe with markers of early endosomes (EEA1), late endosomes (Rab7) and lysosomes (lysotracker). Our results showed that PI5P is preferentially localized

on late compartments compared to early compartments (Figure 1G-H). As shown in supplemental Figure 2A, in differentiated MEG-01 cells, PI5P did not localize with PI3P-rich compartments labeled by the 2XFYVE probe.

PI5P localization on alpha and dense granules in MEG-01 cells

MK are specialized in platelets production and have a highly dynamic membrane remodeling and trafficking. They contain specific compartments such as MVB at the origin of AG and DG that will be loaded in platelets. These are present in differentiated MEG-01 cell line where they are believed to originate from MVB/late endosomes ⁸. We therefore checked whether PI5P was present on those specific granules. We first resorted to immunofluorescence studies using the DG integral membrane protein LAMP2 and the AG cytokine PF4 and showed that PI5P, labeled by the mCherry-PHD probe, was present on both granules (Figure 2A), as shown by determination of the Pearson's coefficient (Figure 2B). This partial colocalization of PI5P was further confirmed by live cell imaging studies, using the serotonin transporter VMAT2 as a marker of DG and the uptake of fluorescent fibrinogen, known to be stored in AG (Figure 2C and quantified in Figure 2D). In order to quantitatively assess PI5P levels in DG vs AG, we next used subcellular fractionation on a linear 10-60% sucrose gradient as described ⁸. Enrichment of each granule was confirmed by immunoblotting the obtained fractions using LAMP2 and MRP4 as a DG marker and PF4 as an AG marker (Figure 2E-F). The pooled DG fractions 7-8-9 and the pooled AG fractions 1-2-3 were assayed for PI5P using the *in vitro* mass assay. As shown in Figure 2G, DG harbor high amounts of PI5P compared to AG, with a 50 fold ratio between the two populations. Overall, these data show that PI5P is present on AG but much more on DG in MEG-01 cells, suggesting a potential role of this lipid in granule biogenesis or maintenance and functions.

PIKfyve is responsible for PI5P synthesis in differentiated MEG-01 cells

The lipid kinase PIKfyve has been shown to be one of the enzymes responsible for PI5P production in mammalian cells¹⁵. The increase in its expression during MEG-01 cells differentiation (see Figure 1B-C) stimulated us to check whether pharmacological inhibitors of PIKfyve would modulate PI5P levels. Inhibition of PIKfyve was achieved using the specific pharmacological inhibitor STA5326, also known as apilimod³⁰. STA5326 did not affect MEG-01 differentiation, as long-term treatment for up to 9 days with the inhibitor had no effect on CD41 and CD61 expressions (supplemental Figure 3A). PI5P levels were then assessed in differentiated MEG-01 cells treated with STA5326 for 16h. Our results showed that STA5326 decreased PI5P in a dose-dependent manner culminating in a 75% reduction with a concentration of 200nM (Figure 3A). Interestingly, the decrease in PI5P was also visualized by imaging as the mCherry-PHD probe was released from the granules to the cytosol following STA5326 treatment (Figure 3B).

Inhibition of PIKfyve affects granules integrity in MEG-01 and primary MK

Treatment of MEG-01 cells with STA5326 for 16h induced a vacuolar phenotype (Figure 3C-D). To check whether STA5326 treatment affected the integrity of the AG and DG in differentiated MEG-01 cells, we labeled DG in live cells with mepacrine, a well-known green fluorescent dye used to label platelet DG³⁹. Mepacrine colocalized with the DG marker VMAT2 allowing its use as a *bona fide* marker for DG in living cells (supplemental Figure 2B). AG were labeled by fluorescent fibrinogen uptake. Live cell fluorescence confocal microscopy analysis. Our data show that PIKfyve inhibition induced the formation of enlarged vacuoles, which lumen were labeled with both mepacrine and fibrinogen, suggesting a fusion of the granules or a mis-sorting of the markers in the vacuoles (Figure 3C). This phenotype was also observed when PIKfyve was inhibited with YM201636 (Supplemental

Figure 3B-C). To confirm these results, we knocked PIKfyve expression down using specific siRNA, reaching a 80% decrease in its expression (supplemental Figure 3E-F). PIKfyve silencing phenocopied STA5326-treatment, with the formation of enlarged vacuoles co-labeled with mepacrine and fibrinogen (supplemental Figure 3G). The effect of PIKfyve inhibition on granule integrity and identity was confirmed on fixed cells where DG and AG were respectively labeled with LAMP2 and PF4. As shown in Figure 3D, STA5326-treatment resulted in a relocalization and a colocalization of both markers on the membrane of the enlarged vacuoles, compared to control cells.

We next analyzed the effect of PIKfyve inhibition on primary MK obtained from CD34+ cells from mice bone marrow. In control primary MK, under differentiation, we observed a partial colocalization of mepacrine and fibrinogen, probably in MVBs, which are at the origin of AG and DG (Figure 3E). Inhibition of PIKfyve induced a massive relocalization of mepacrine and fibrinogen in some of the enlarged vacuoles, confirming the role of PIKfyve in the maintenance of the granule or premature granules in primary MK. Some vacuoles were however exclusively labeled with mepacrine, suggesting the persistence of some intact sorting in differentiating primary MK (Figure 3E). To check whether PIKfyve inhibition induces a loss of identity of mature AG and DG, we inhibited the kinase in platelets. Remarkably, treatment with STA5326 also led to a loss of granule identity in platelets. Indeed, an increased colocalization of Von Willebrand Factor (vWF) and serotonin, used to label AG and DG respectively was observed following STA5326 (Figure 3F) and quantified by analysis of Pearson's coefficient (Figure 3G).

Addition of exogenous PI5P restores granule integrity and identity after PIKfyve inhibition

Since STA5326 is a reversible inhibitor, we wondered if granules integrity would be restored after washout of the inhibitor. MEG-01 cells treated with STA5326 for 16h were extensively washed with PBS and further incubated in medium for up to 3 days. We observed that 24h after washout, the identity of DG was restored (as shown by the localization of mepacrine), while a longer time was needed for AG (as shown by the fibrinogen staining, Figure 4A). However, after 72h, both AG and DG identity was fully restored and the phenotype of the cells was indistinguishable from the control indicating a fully the reversibility of the process after a few days.

We next questioned the ability of exogenous cell-permeant PIs to overcome PIKfyve inhibition. To test whether the observed phenotype following PIKfyve inhibition was dependent on the defect of PI5P production, MEG-01 cells treated with STA5326 for 16h were quick-washed with PBS before addition of increasing concentrations of exogenous PI5P. 20 min after the addition of 15 μ M PI5P, we observed a partial restoration of DG and AG identity, with some remaining enlarged vacuoles colabeled with mepacrine and fibrinogen (Figure 4B). At this concentration of lipid, a longer incubation time was needed to completely restore granule identity (i.e. up to 5h, data not shown). Increasing PI5P concentration to 50 μ M lead to the complete restoration of granules identity within 20 min (Figure 4B). The effect of PI5P addition was quantified in Figure 4C, where the area of granules labeled with either mepacrine or fibrinogen was measured. These results suggest that the effect of PIKfyve on granule identity is PI5P dependent.

Addition of exogenous PI5P restores granule mobility after PIKfyve inhibition

As inhibition of PIKfyve affects granule identity we wonder if it could also affect their mobility. We first characterized DG and AG mobility in differentiated MEG-01 cells. AG were labeled with fluorescent fibrinogen and their mobility was analyzed by time lapsed

confocal microscopy and images were extracted (Supplemental Figure 4). Treatment of cells with the actin polymerization inhibitor cytochalasin D did not perturb the mobility of the AG (Supplemental Figure 4, Cyto D). Conversely, treatment with nocodazole, an inhibitor of microtubule polymerization induced a total arrest of AG mobility (Supplemental Figure 4, Nocodazole). The same results were observed for DG labeled with mepacrine (data not shown) and confirmed in MEG-01 the role of microtubules in granules mobility previously observed in primary MK⁴⁰.

Strikingly, granule mobility was lost after PIKfyve inhibition by STA5326 (Figure 4D-E, STA5326 and Supplemental movie 1-2) or by YM201636 (Supplemental figure 3D) compared to vehicle treated MEG-01. These data indicate that granule mobility in MEG-01 cells is dependent on PIKfyve activity. Next, we investigated granule dynamics in washed out cells. In contrast to granule identity, even after 72h their mobility was not restored as shown in Figure 4D-E and in supplemental video 3 for DG labeled with mepacrine. Similar results were obtained on AG (data not shown). These data suggest that the effect of PIKfyve inhibition on granule mobility is not reversible even after 72h and is therefore molecularly distinct from the reacquisition of granule identity. Remarkably, addition of exogenous PI5P was able to restore granule mobility in STA5326-treated cells (Figure 4D, 50 μ M PI5P and supplemental movie 4), suggesting that PIKfyve inhibitory effect on granule mobility is PI5P dependent.

PIKfyve inhibition affects human blood platelet functions

As we observed that PIKfyve inhibition by STA5326 led to a loss of granules identity in platelets (see Figure 3F-G), we questioned if PIKfyve inhibition would impact on platelet functions. As shown in Figure 5A, platelet secretion measured on whole blood challenged with the agonist CRP (collagen-related peptide) was significantly decreased by STA5326.

Moreover, platelet thrombus formation on collagen matrix using whole blood perfused in a microfluidic flow assay was strongly reduced by PIKfyve inhibition (Figure 5 B-C). This effect was observed under conditions of normal arterial shear rate (1500 s^{-1}) and was even more pronounced under pathological shear rate conditions (4000 s^{-1}). Platelet thrombus formation under flow is known to require granule secretion (ref inhibition par ADP). The volume of the thrombus formed at the end of the blood perfusion was significantly reduced by STA5326 treatment in both low and high shear stress conditions (Figure 5E). In conclusion, these data demonstrate for the first time that inhibition of PIKfyve affects granule identity and platelet thrombus formation under flow.

Discussion

Platelet granule integrity is a key element for platelet functions and the molecular mechanisms involved in the biogenesis and maintenance of these granules are challenging to apprehend due to the difficulty to assess membrane trafficking in these cells. Granules are generated in bone marrow MK, which are primary cells difficult to handle, transfect and cultivate. We therefore turned to the megakaryocytic cell line MEG-01, which on many points resembles primary MK and has been used and validated to study DG biogenesis⁸. Although a role for PI5P in platelets was foreseen years ago, as its production was shown to increase under platelet activation with agonists like thrombin⁴¹, its precise role remained unknown. Taking advantage of the availability of a selective PIKfyve inhibitor, STA5326³⁰, we demonstrate here a new role for this kinase and its product PI5P in the maintenance of the integrity and the mobility of AG and DG granules.

In this study we found that PI5P localizes on late compartments, i.e. late endosomes and lysosomes. This is in contrast to our previous reports using HeLa, BHK or MEF cells where PI5P localizes on early/signaling endosomes^{17, 42}. However, in those studies PI5P was produced by the bacterial 4-phosphatase IpgD that hijack the PIs metabolism and produces PI5P from plasma membrane PI(4,5)P₂. Here, in MEG-01 cells, we observed that PIKfyve an important enzyme in the synthesis of PI5P, as its inhibition with STA5326 reduced PI5P by 75%. The remaining 25% is most likely synthesized by the action of lipid phosphatases like the PI(4,5)P₂ 4-phosphatase^{16, 43}. PIKfyve⁴⁴ and myotubularins⁴⁵ have been localized on late endosomal compartments, which is consistent with our observation that PI5P localizes in MEG-01 cells on a Rab7-positive compartment, i.e. late endosomes. We also observed that expression of the myotubularins MTM1 and MTMR2 as well as of the class III PI3-kinase (Vps34) increased during MEG-01 differentiation, suggesting that they may potentially

contribute to PI5P metabolism. In beta-pancreatic cells, PI5P was mainly present on plasma membrane, endoplasmic reticulum and/or golgi and the knockdown of the type II PI5P4K α , that transforms PI5P into PI(4,5)P₂, resulted in an increase of PI5P that was then enriched in endoplasmic reticulum/golgi⁴⁶. These observations support the notion of specific PI5P pools generated from different enzymatic source depending on the cell type. Here we show for the first time that PI5P is present on the specialized secretory AG and DG compartments. Quantification of PI5P by a mass assay revealed strong differences, PI5P being 50 fold higher in DG than AG. As these granules are generated from late endosomes, we can propose that there might be a specific sorting mechanism to concentrate PI5P to DG rather than AG. Alternatively, this specific PI5P pool could arise from *in situ* synthesis. More work is needed to clarify this point.

In MK, granules reach proplatelets tips by a bidirectional movement involving the travel of granules along microtubules and the sliding of microtubules relative to each other⁴⁰. We confirmed the role of microtubules in granule trafficking in MEG-01 cells using nocodazole. Our data also show a role for PIKfyve in granule motility in MEG-01 cells. Such a role has been recently proposed on late endosome motility in neuronal dendrites⁴⁷. The authors proposed that PIKfyve function on motility is an indirect consequence of its role on the vesicle integrity. This might not be the case in our study as we found that following the washout of STA5326, integrity of the DG was restored but not their motility, suggesting that integrity and motility are not directly linked. It is also possible that STA5326 traps PIKfyve together with a binding partner involved in granule motility along microtubules. Such an interaction would be more difficult to reverse by washout alone. A link between PIKfyve and microtubules has been proposed through its interaction with JLP, a kinesin adaptor⁴⁸, however the putative function of JLP in MK granule motility is still to be determined.

In contrast to the washout of the inhibitor, addition of exogenous PI5P following PIKfyve inhibition was able to restore granule identity and motility. Our results could be explained by considering different turnover rates for the different pools of PI5P in cells. Indeed, one could postulate that the basal amount of PI5P necessary to ensure granule identity could be restored quickly after STA5326-washout (fast turnover), while higher concentration of PI5P (slow turnover) would be necessary to ensure granule motility through the recruitment of specific PI5P-effector needed for this transport.

In platelets, granules are filled with molecules ready to be used following platelet activation to ensure efficient hemostasis and also wound healing. Remarkably, inhibition of PIKfyve also induced the formation of chimeric granules bearing both AG and DG markers. This is the first description of such a role for PIKfyve. Consistent with this redistribution, we observed a defect in CRP-induced platelet secretion after STA5326 treatment. Thrombus formation under arterial or pathological shear rate on collagen matrix was also affected by PIKfyve inhibition with a significant reduction of the thrombus formation. Recently, Min and colleagues developed a mouse model exhibiting a knockout of PIKfyve in the MK lineage⁴⁹. This specific knockout led to an increased arterial thrombosis, with a defect in the maturation of lysosomes in platelets resulting in excessive release of lysosomal enzymes. This was accompanied by a multi-organ defect and an increased inflammatory response in these mice. It is interesting to note that PIKfyve inhibition by STA5326 or APY0201 has been shown to result in anti-inflammatory response in cells^{30, 31}. These discrepancies could be the consequence of the long-term ablation of the protein all along the MK maturation process in the bone marrow or due to the knockout strategy used by the authors. Indeed, they targeted the kinase activation loop of PIKfyve (exons 37-38), probably hoping to conserve some docking activities (i.e. binding partners), with a total loss of the enzymatic activity. These two

strategies are very different of the acute inhibition of the kinase by pharmacological inhibitors. Moreover, one cannot rule out potential side effect of PIKfyve ablation with compensatory mechanisms or loss of expression of PIKfyve partners.

In conclusion, we unravel in this study the role of PIKfyve in the control of the integrity and the motility of AG and DG granules in the megakaryocytic cell line MEG-01 through its product PI5P. In addition, we show that pharmacological inhibition of PIKfyve impairs granule identity in platelets and affects platelet functions. This paves the way to the use of PIKfyve inhibitors as anti-thrombotic strategies, although more work needs to be done to clarify the molecular mechanisms involved.

Acknowledgments

The authors declare that they have no conflict of interest. This study was supported by research funding from Inserm and XX. R.M. is a fellow of the Société Française d'Hématologie. B.P. is a scholar of the Institut Universitaire de France.

We thank the Genotoul Imaging facilities (INSERM U1048, R. D'Angelo and M. Zanoun).

Authorship contributions

RM, FB, SS and JMX performed the experiments. RM and HT designed the experiments; RM, FB, SS, BP and HT analyzed the data. RM, FB, BP and HT wrote the paper. OK contributed to tools and discussion. BP and HT oversaw the project.

Disclosure of conflict of interest

References

1. Gremmel, T., Frelinger, A.L., 3rd & Michelson, A.D. Platelet Physiology. *Seminars in thrombosis and hemostasis* (2016).
2. Battinelli, E.M., Hartwig, J.H. & Italiano, J.E., Jr. Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Curr Opin Hematol* 14, 419-426 (2007).
3. Machlus, K.R. & Italiano, J.E., Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* 201, 785-796 (2013).
4. Huizing, M., Anikster, Y. & Gahl, W.A. Hermansky-Pudlak syndrome and Chediak-Higashi syndrome: disorders of vesicle formation and trafficking. *Thromb Haemost* 86, 233-245 (2001).
5. Watanabe, R. *et al.* Bernard-soulier syndrome with a homozygous 13 base pair deletion in the signal peptide-coding region of the platelet glycoprotein Ib(beta) gene. *Blood Coagul Fibrinolysis* 14, 387-394 (2003).
6. Nurden, A.T. & Nurden, P. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease. *Blood reviews* 21, 21-36 (2007).
7. Youssefian, T. & Cramer, E.M. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood* 95, 4004-4007 (2000).
8. Ambrosio, A.L., Boyle, J.A. & Di Pietro, S.M. Mechanism of platelet dense granule biogenesis: study of cargo transport and function of Rab32 and Rab38 in a model system. *Blood* 120, 4072-4081 (2012).
9. Blair, P. & Flaumenhaft, R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews* 23, 177-189 (2009).
10. King, S.M. & Reed, G.L. Development of platelet secretory granules. *Semin Cell Dev Biol* 13, 293-302 (2002).
11. Flaumenhaft, R. Monitoring granule traffic in megakaryocytes. *Blood* 120, 3869-3870 (2012).
12. Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651-657 (2006).
13. Balla, T. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiological reviews* 93, 1019-1137 (2013).
14. Min, S.H. & Abrams, C.S. Regulation of platelet plug formation by phosphoinositide metabolism. *Blood* 122, 1358-1365 (2013).
15. Shisheva, A. PtdIns5P: news and views of its appearance, disappearance and deeds. *Arch Biochem Biophys* 538, 171-180 (2013).
16. Viaud, J., Boal, F., Tronchere, H., Gaits-Iacovoni, F. & Payrastra, B. Phosphatidylinositol 5-phosphate: a nuclear stress lipid and a tuner of membranes and cytoskeleton dynamics. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 36, 260-272 (2014).
17. Boal, F. *et al.* TOM1 is a PI5P effector involved in the regulation of endosomal maturation. *J Cell Sci* 128, 815-827 (2015).
18. Boal, F. *et al.* PI5P Triggers ICAM-1 Degradation in Shigella Infected Cells, Thus Dampening Immune Cell Recruitment. *Cell reports* 14, 750-759 (2016).
19. Oppelt, A. *et al.* Production of phosphatidylinositol 5-phosphate via PIKfyve and MTMR3 regulates cell migration. *EMBO Rep* 14, 57-64 (2013).
20. Viaud, J. *et al.* Phosphatidylinositol 5-phosphate regulates invasion through binding and activation of Tiam1. *Nature communications* 5, 4080 (2014).
21. Tronchere, H. *et al.* Production of phosphatidylinositol 5-phosphate by the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin in mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 7304-7312 (2004).
22. Rutherford, A.C. *et al.* The mammalian phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) regulates endosome-to-TGN retrograde transport. *J Cell Sci* 119, 3944-3957 (2006).

23. de Lartigue, J. *et al.* PIKfyve regulation of endosome-linked pathways. *Traffic* 10, 883-893 (2009).
24. Strutz-Seebohm, N. *et al.* PIKfyve in the SGK1 mediated regulation of the creatine transporter SLC6A8. *Cell Physiol Biochem* 20, 729-734 (2007).
25. Berwick, D.C. *et al.* Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles. *J Cell Sci* 117, 5985-5993 (2004).
26. Sbrissa, D., Ikononov, O.C., Strakova, J. & Shisheva, A. Role for a novel signaling intermediate, phosphatidylinositol 5-phosphate, in insulin-regulated F-actin stress fiber breakdown and GLUT4 translocation. *Endocrinology* 145, 4853-4865 (2004).
27. Osborne, S.L. *et al.* PIKfyve Negatively Regulates Exocytosis in Neurosecretory Cells. *J Biol Chem* 283, 2804-2813 (2008).
28. Dupuis-Coronas, S. *et al.* The nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase oncogene interacts, activates, and uses the kinase PIKfyve to increase invasiveness. *J Biol Chem* 286, 32105-32114 (2011).
29. Jefferies, H.B. *et al.* A selective PIKfyve inhibitor blocks PtdIns(3,5)P(2) production and disrupts endomembrane transport and retroviral budding. *EMBO Rep* 9, 164-170 (2008).
30. Cai, X. *et al.* PIKfyve, a class III PI kinase, is the target of the small molecular IL-12/IL-23 inhibitor apilimod and a player in Toll-like receptor signaling. *Chemistry & biology* 20, 912-921 (2013).
31. Hayakawa, N. *et al.* Structure-activity relationship study, target identification, and pharmacological characterization of a small molecular IL-12/23 inhibitor, APY0201. *Bioorganic & medicinal chemistry* 22, 3021-3029 (2014).
32. Kim, G.H., Dayam, R.M., Prashar, A., Terebiznik, M. & Botelho, R.J. PIKfyve inhibition interferes with phagosome and endosome maturation in macrophages. *Traffic* 15, 1143-1163 (2014).
33. Burakoff, R. *et al.* A phase 1/2A trial of STA 5326, an oral interleukin-12/23 inhibitor, in patients with active moderate to severe Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 12, 558-565 (2006).
34. Ogura, M. *et al.* Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 66, 1384-1392 (1985).
35. Schweinfurth, N., Hohmann, S., Deuschle, M., Lederbogen, F. & Schloss, P. Valproic acid and all trans retinoic acid differentially induce megakaryopoiesis and platelet-like particle formation from the megakaryoblastic cell line MEG-01. *Platelets* 21, 648-657 (2010).
36. Pendaries, C. *et al.* PtdIns5P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during *Shigella flexneri* infection. *Embo J* 25, 1024-1034 (2006).
37. Coronas, S. *et al.* Elevated levels of PtdIns5P in NPM-ALK transformed cells: implication of PIKfyve. *Biochem Biophys Res Commun* 372, 351-355 (2008).
38. Gozani, O. *et al.* The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 114, 99-111 (2003).
39. Ramstrom, A.S., Fagerberg, I.H. & Lindahl, T.L. A flow cytometric assay for the study of dense granule storage and release in human platelets. *Platelets* 10, 153-158 (1999).
40. Richardson, J.L., Shivdasani, R.A., Boers, C., Hartwig, J.H. & Italiano, J.E., Jr. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* 106, 4066-4075 (2005).
41. Morris, J.B., Hinchliffe, K.A., Ciruela, A., Letcher, A.J. & Irvine, R.F. Thrombin stimulation of platelets causes an increase in phosphatidylinositol 5-phosphate revealed by mass assay. *FEBS Lett* 475, 57-60 (2000).
42. Ramel, D. *et al.* *Shigella flexneri* infection generates the lipid PI5P to alter endocytosis and prevent termination of EGFR signaling. *Science signaling* 4, ra61 (2011).
43. Ungewickell, A. *et al.* The identification and characterization of two phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18854-18859 (2005).
44. Shisheva, A. PIKfyve: Partners, significance, debates and paradoxes. *Cell Biol Int* 32, 591-604 (2008).

45. Cao, C., Backer, J.M., Laporte, J., Bedrick, E.J. & Wandinger-Ness, A. Sequential actions of myotubularin lipid phosphatases regulate endosomal PI(3)P and growth factor receptor trafficking. *Mol Biol Cell* 19, 3334-3346 (2008).
46. Sarkes, D. & Rameh, L.E. A novel HPLC-based approach makes possible the spatial characterization of cellular PtdIns5P and other phosphoinositides. *Biochem J* 428, 375-384 (2010).
47. Tsuruta, F. & Dolmetsch, R.E. PIKfyve mediates the motility of late endosomes and lysosomes in neuronal dendrites. *Neuroscience letters* 605, 18-23 (2015).
48. Ikonomov, O.C. *et al.* Kinesin adapter JLP links PIKfyve to microtubule-based endosome-to-trans-Golgi network traffic of furin. *J Biol Chem* 284, 3750-3761 (2009).
49. Min, S.H. *et al.* Loss of PIKfyve in platelets causes a lysosomal disease leading to inflammation and thrombosis in mice. *Nature communications* 5, 4691 (2014).

Figure legends

Figure 1: PI5P levels increases during MEG-O1 differentiation and is localized on late compartments

(A) Total lipids were extracted from $10 \cdot 10^6$ MEG-01 cells treated or not with $2 \cdot 10^{-3}$ M valproic acid (VA) for 5 days and PI5P levels were measured using a mass assay as described in Methods. Data represent the average of 5 independent experiments. ****P < .01** compared to D0. (B) Schematic representation of the metabolic pathways for PI5P synthesis (C) Lysates from control or differentiated MEG-01 cells were resolved by western blot and analyzed for PIKfyve, MTM1, MTMR2 and Vps34 protein expression with appropriate antibodies. Hsc70 was used as a loading control. (D) Quantification of (C) from 3 to 5 independent experiments. (E) MEG-01 cells differentiated with VA for 5 days were fixed, permeabilized and PI5P was localized with the biotinylated Bio-GST-2XPHD_{ING2} recombinant probe revealed with streptavidin Alexa-594. (F) MEG-01 cells were nucleofected with the mcherry-PHD encoding vector and differentiated with VA for 5 days on fibronectin-coated chambers. (G) Differentiated MEG-01 cells were nucleofected with the mcherry-PHD or GFP-PHD encoding vectors, fixed, permeabilized and stained with the different antibodies. LysoTracker was added 30 min prior to cell fixation. (H) Pearson's coefficient assessing the colocalization of the PHD probe *vs* markers. *****P < .001** compared to EEA1.

Figure 2: PI5P is present on alpha and dense granules

(A) MEG-01 cells were nucleofected with the mcherry-PHD encoding vector and differentiated with VA for 5 days on fibronectin coated coverslips. Cells were fixed, permeabilized and stained with Lamp2 or PF4 markers. (B) Pearson's coefficient assessing the colocalization of the PHD probe *vs* markers. (C) MEG-01 overexpressing the indicated constructs were incubated when required with fluorescent fibrinogen (D) Pearson's

coefficient assessing the colocalization of the PHD probe vs markers. (E) MEG-01 cells differentiated for 5 days were fractionated as described in Methods. Fractions were resolved by western blot and analyzed for MRP4, PF4 and Lamp2 protein expression. (F) Quantification of (E) from 3 independent experiments. (G) Lipids were extracted from pooled AG and DG fractions and PI5P level was measured using a mass assay as described in Methods. Results represent the averages of 3 independent experiments. **P <.01 compared to AG.

Figure 3: STA5326 decreases PI5P levels and affect granule identity

(A) Lipids were extracted from differentiated MEG-01 cells treated or not with STA5326 and PI5P levels were measured using a mass assay as described in Methods. Data represent the averages of 3 independent experiments *P < 0.05 ***P < .01 compared to untreated cells. (B) MEG-01 cells expressing mcherry-PHD, differentiated with VA for 5 days were treated or not with STA5326 and fixed. (C) Differentiated MEG-01 treated or not with STA5326 were incubated with fluorescent fibrinogen and with mepacrine 30min before observation. (D) Differentiated MEG-01 treated or not with STA5326 were fixed, permeabilized and stained for Lamp2 and PF4 MEG-01 cells transfected with control siRNA (siControl) or siRNA targeting PIKfyve were treated or not with STA5326 and analyzed like in (C). (E) Primary MK treated or not with 1µM of STA5326 were incubated with fibrinogen and mepacrine like in (C). (F) Resting platelet from PRP treated or not for 1h with 1µM of STA5326 were fixed, permeabilized and stained with the indicated antibodies (G) Pearson's coefficient assessing the colocalization of serotonin and vWF.

Figure 4: Restoration of normal granules phenotype by PI5P

(A) Differentiated MEG-01 cells treated or not with STA5326 were washed out for 24h or 72h and incubated with fluorescent fibrinogen and with mepacrine 30 min before observation. (B) Differentiated MEG-01 cells were treated as in (A) and 15 or 50 μ M of C4-PI5P was added prior to imaging. (C) Quantification of the area of dense or alpha granules from (B). (D) Differentiated MEG-01 cells treated like in (A, wash 72h) or (B, STA5326+50 μ M PI5P) were imaged for time-lapse confocal microscopy. “V” labels the enlarged vacuoles. (E) Velocity of dense granules was calculated for each condition described above. Graphs represent the averages of multiple independent cells and are mean \pm SEM; Student t test ***P<.001.

Figure 5: PIKfyve inhibition affects platelet functions

(A) Whole blood was treated or not for 1h with 1 μ M of STA5326 and ATP secretion was measured after stimulation with CRP 0.5 μ g/ml. (B) DIOC₆-labeled platelets in whole blood treated or not with 1 μ M STA5326 were perfused through a collagen-coated microcapillary at a physiological arterial shear rate of 1500 s⁻¹ followed by a high pathological, shear rate of 4000 s⁻¹. Results shown are mean of 6 separate experiments. (C). Quantification of the thrombi volumes from (D). Graphs represent the averages of 6 independent experiments; Student t test *P < .05 **P < .01.

SUPPLEMENTAL FIGURE 1

(A) MEG-01 cells treated or not with $2 \cdot 10^{-3}$ M VA for the time indicated were analyzed with Nikon Eclipse II microscope equipped with a x40 objective. Arrow show MEG-01 proplatelets (B) Flow cytometry analysis of MEG-01 cells treated or not with $2 \cdot 10^{-3}$ M valproic acid (VA) for the time indicated. Cells were stained with CD41 and CD61 antibodies. Graphs represent the averages of 3 independent experiments and are mean \pm SEM. (C) Real-time PCR analysis of MTM1, MTMR2, PIKfyve, Vps34 and CD61 expression in MEG-01 cells. Gene transcripts were quantified using HSP70 expression that did not vary as an internal control. Graphs represent the averages of 3 independent experiments and are mean \pm SEM.

SUPPLEMENTAL FIGURE 2

(A) GFP-2xFYVE and mcherry-PHD encoding vector were co-nucleofected in MEG-01 cells and cells were differentiated with VA for 5 days on fibronectin-coated chambers. (B) mcherry-VMAT2 encoding vector was nucleofected in MEG-01 cells and cells were differentiated with VA for 5 days on fibronectin-coated chambers then treated for 30 min with 10 mM mepacrine to decorate dense granules.

SUPPLEMENTAL FIGURE 3

(A) Flow cytometry analysis of MEG-01 cells treated or not with $2 \cdot 10^{-3}$ M VA and 100nM STA5326 for the time indicated. Cells were stained with CD41 and CD61 antibodies. Graphs represent the averages of 3 independent experiments and are mean \pm SEM. (B) Differentiated MEG-01 treated or not with YM201636 were incubated with fluorescent fibrinogen and with mepacrine 30min before observation (C) Pearson's coefficient assessing the colocalization of mepacrine vs fibrinogen and quantification. (D) Velocity of dense granules was calculated for control or YM201636 treated cells. (E) Lysates from transfected MEG-01 cells with siControl or siPIKfyve were resolved by western blot and analyzed for PIKfyve protein expression with appropriate antibodies. Loading control was determined with HSC70 antibody. (F) Values were normalized to the level of PIKfyve expression in control cells. (G) Differentiated MEG-01 treated with siControl or siPIKfyve were incubated with fluorescent fibrinogen and with mepacrine 30min before observation. Graphs represent the averages of 5 independent experiments and are mean \pm SEM.

SUPPLEMENTAL FIGURE 4

Differentiated MEG-01 cells treated with fibrinogen alexa-594 overnight were incubated with $2\mu\text{M}$ of cytochalasine D or $10\mu\text{M}$ of nocodazole for 30 min before recording.

Figure 1

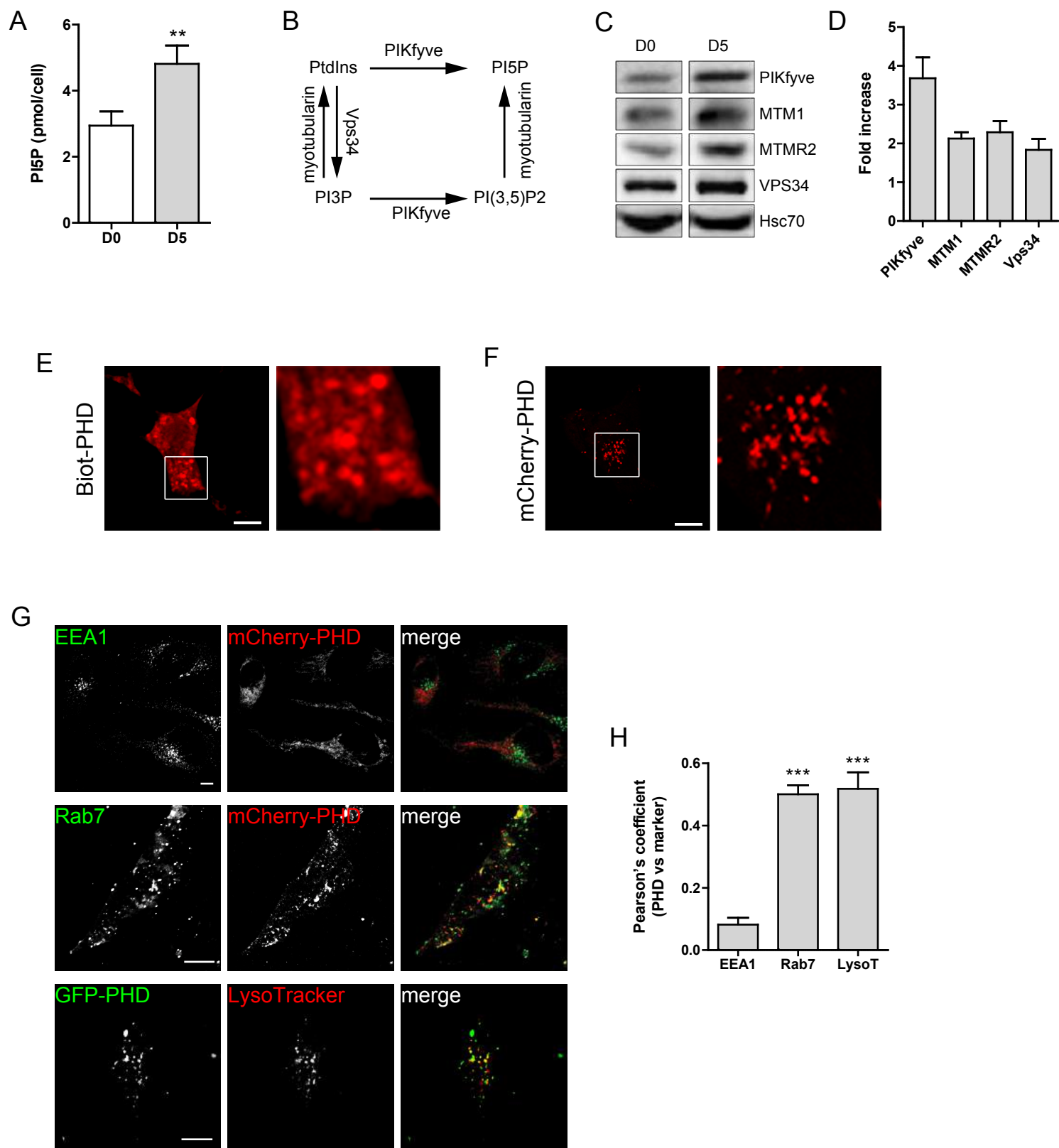
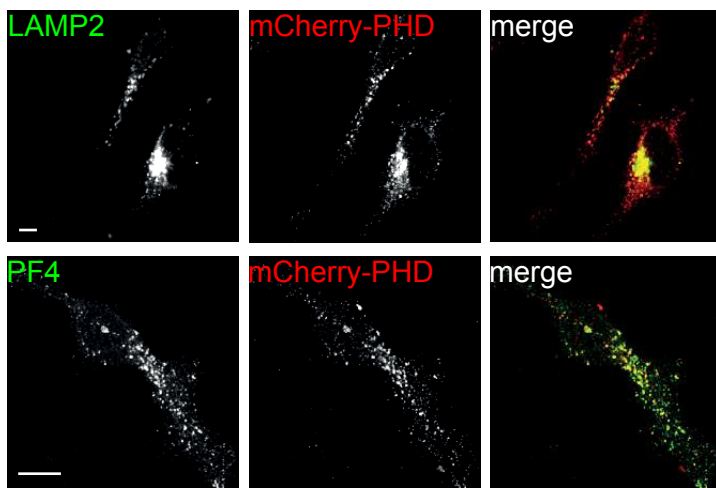
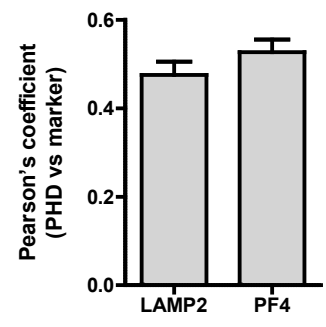


Figure 2

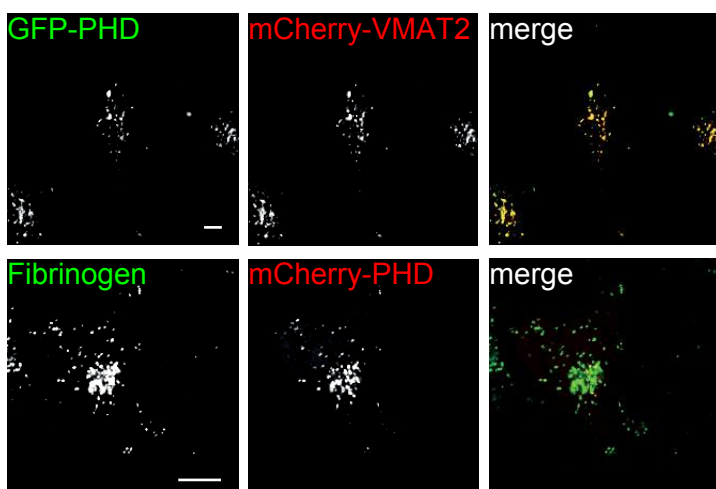
A



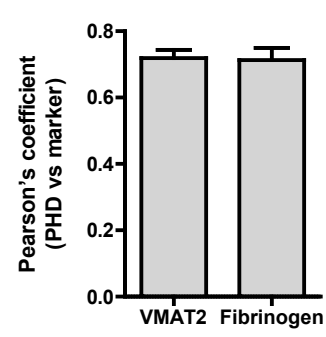
B



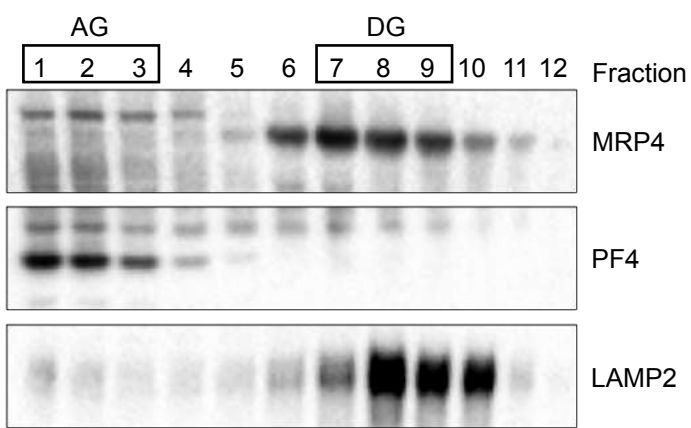
C



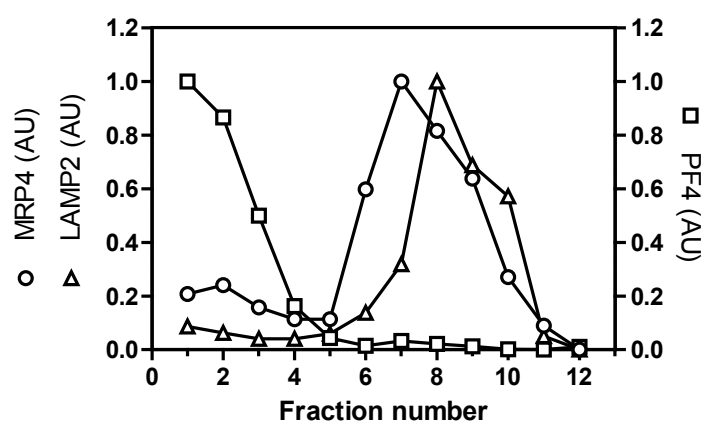
D



E



F



G

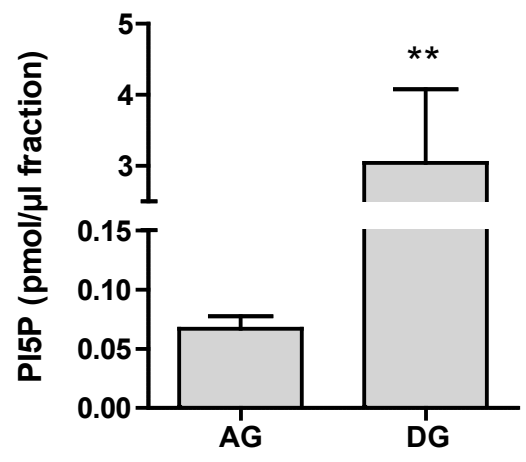


Figure 3

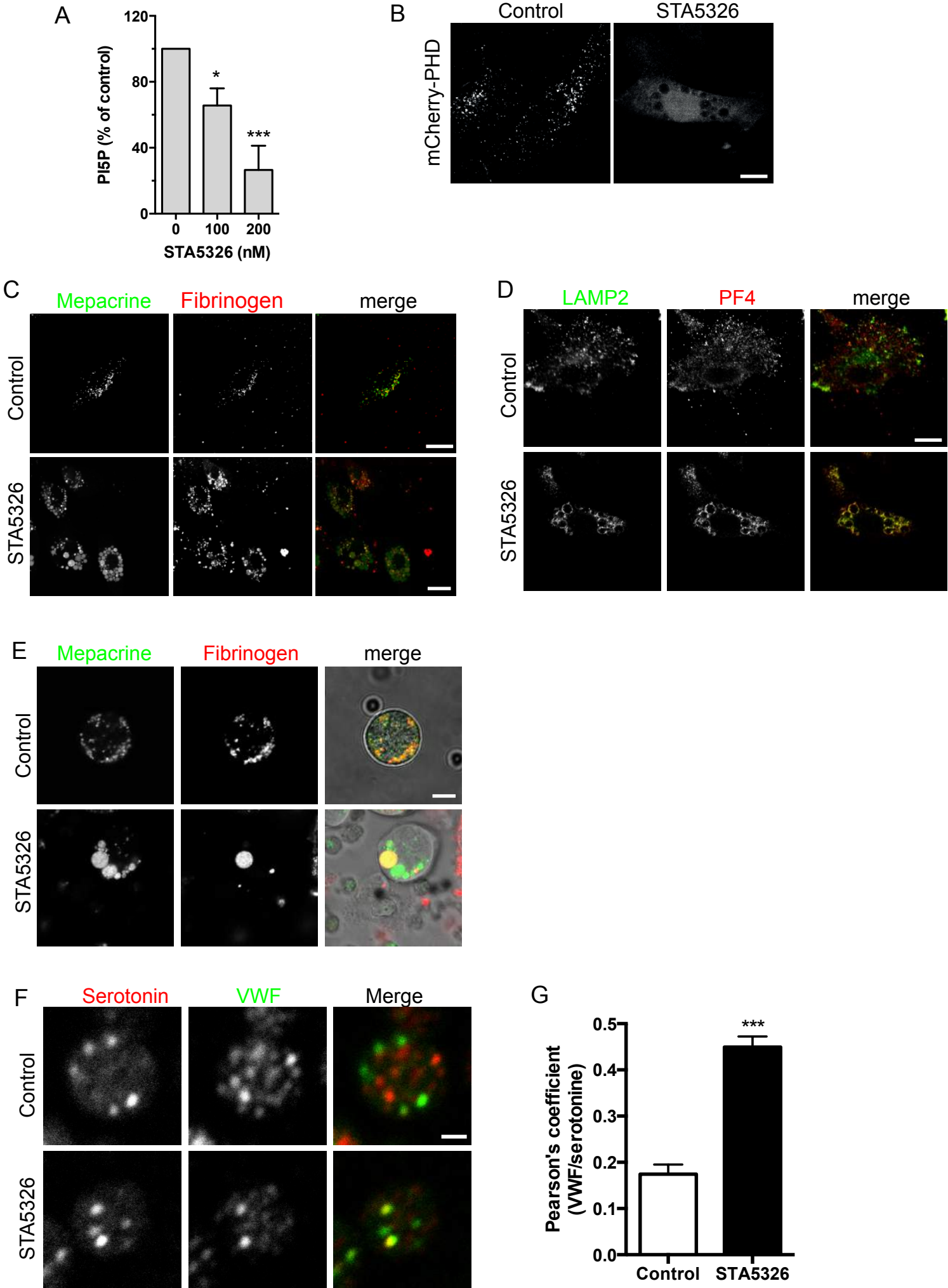


Figure 4

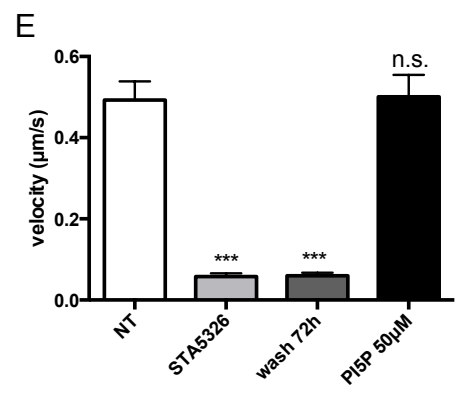
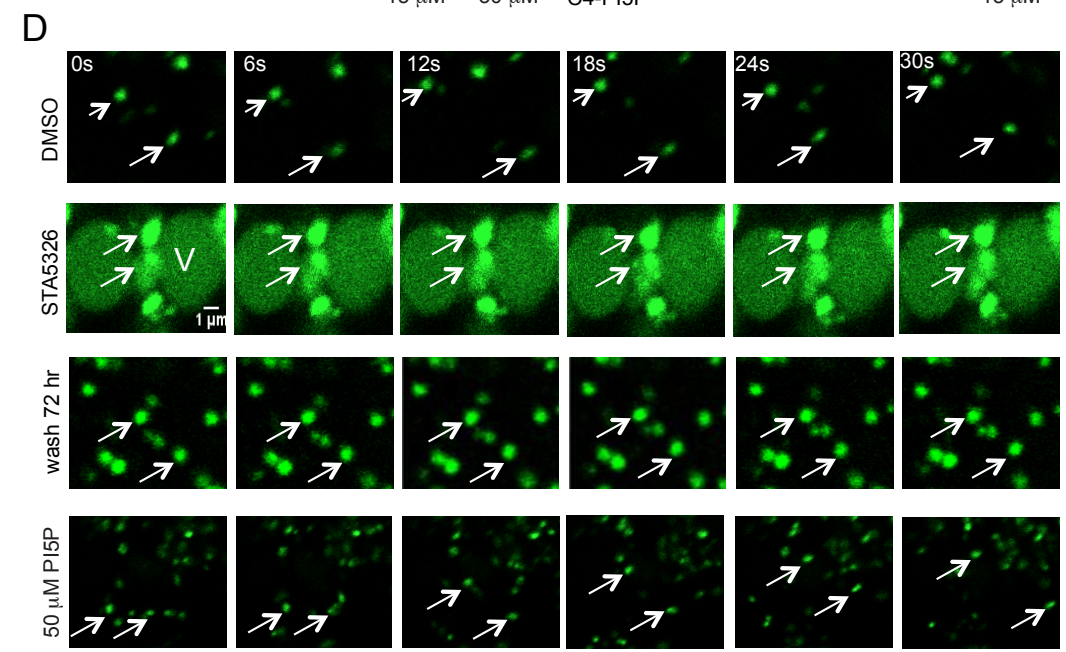
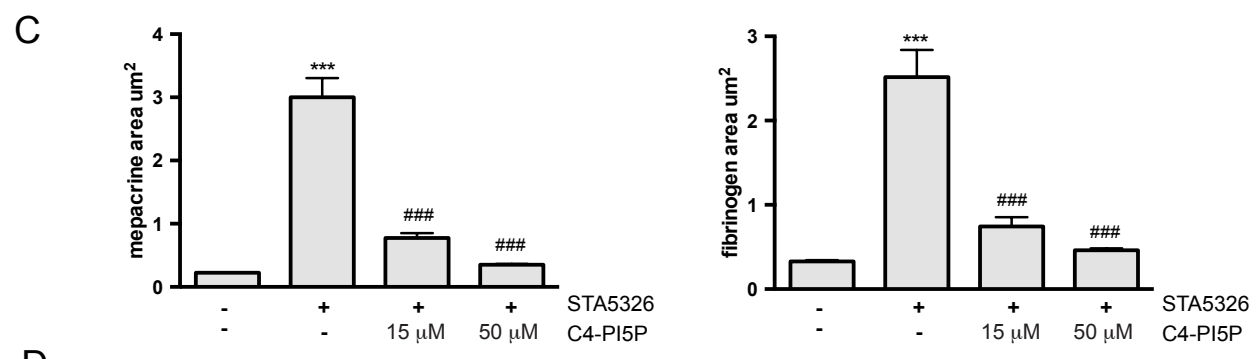
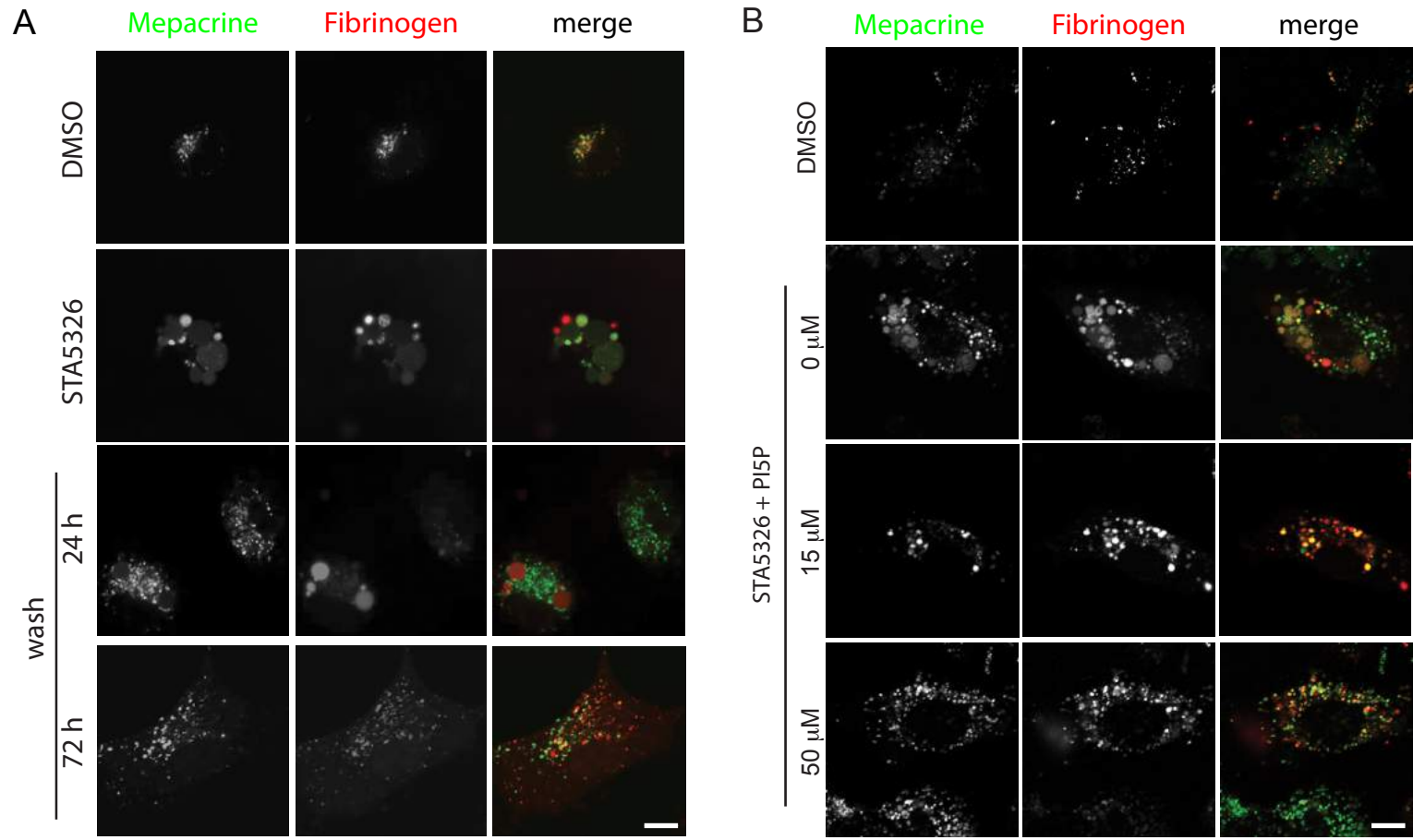
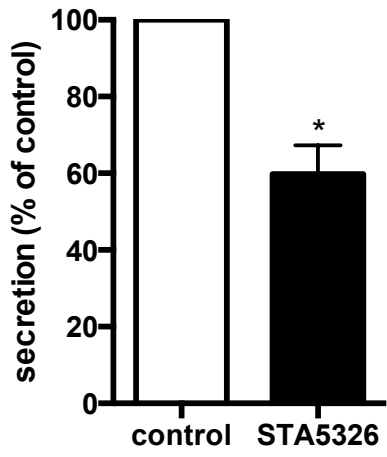
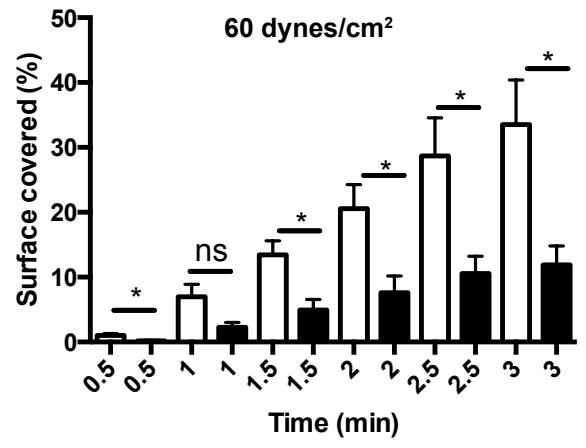


Figure 5

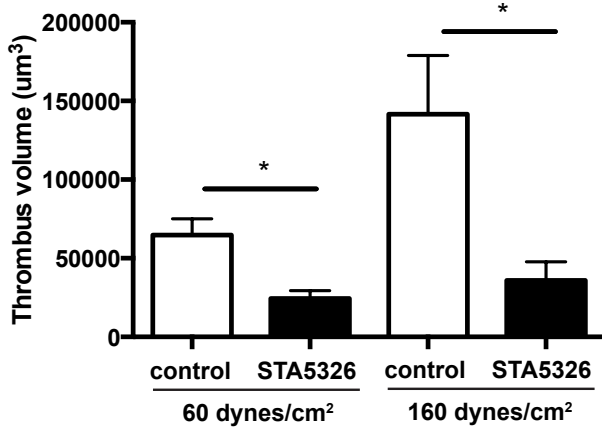
A



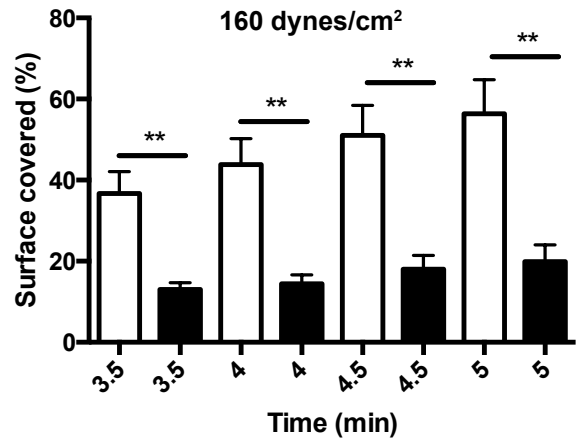
B



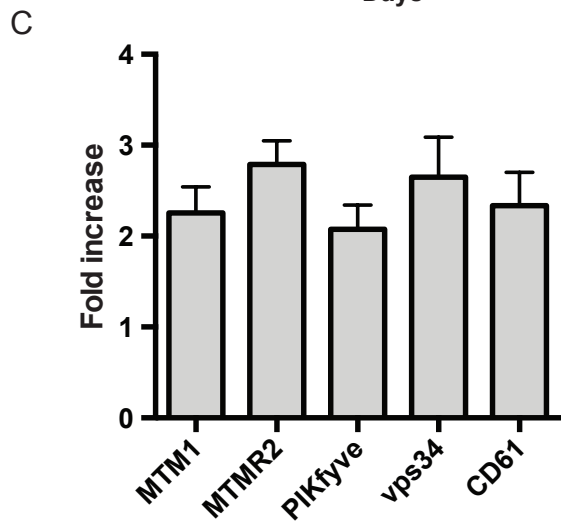
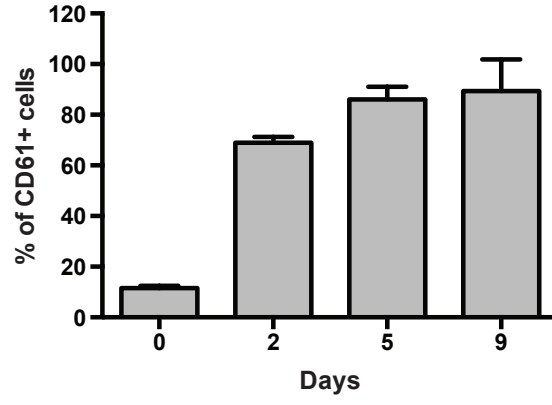
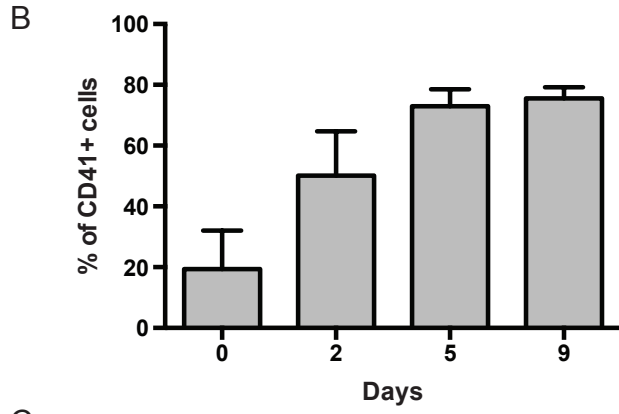
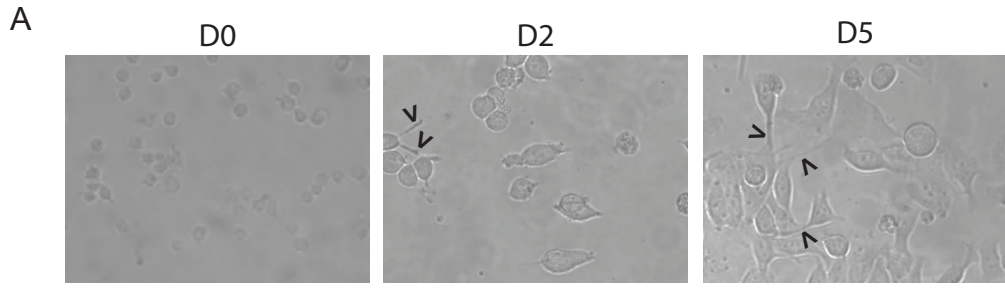
D



C

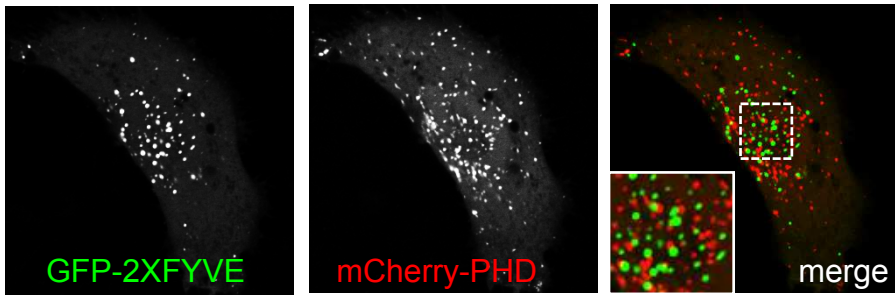


Sup figure 1

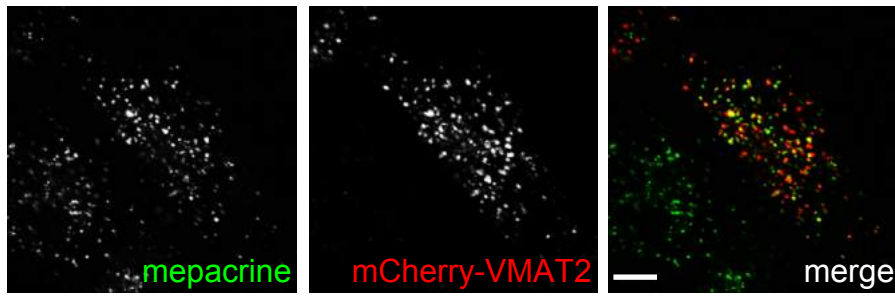


Sup figure 2

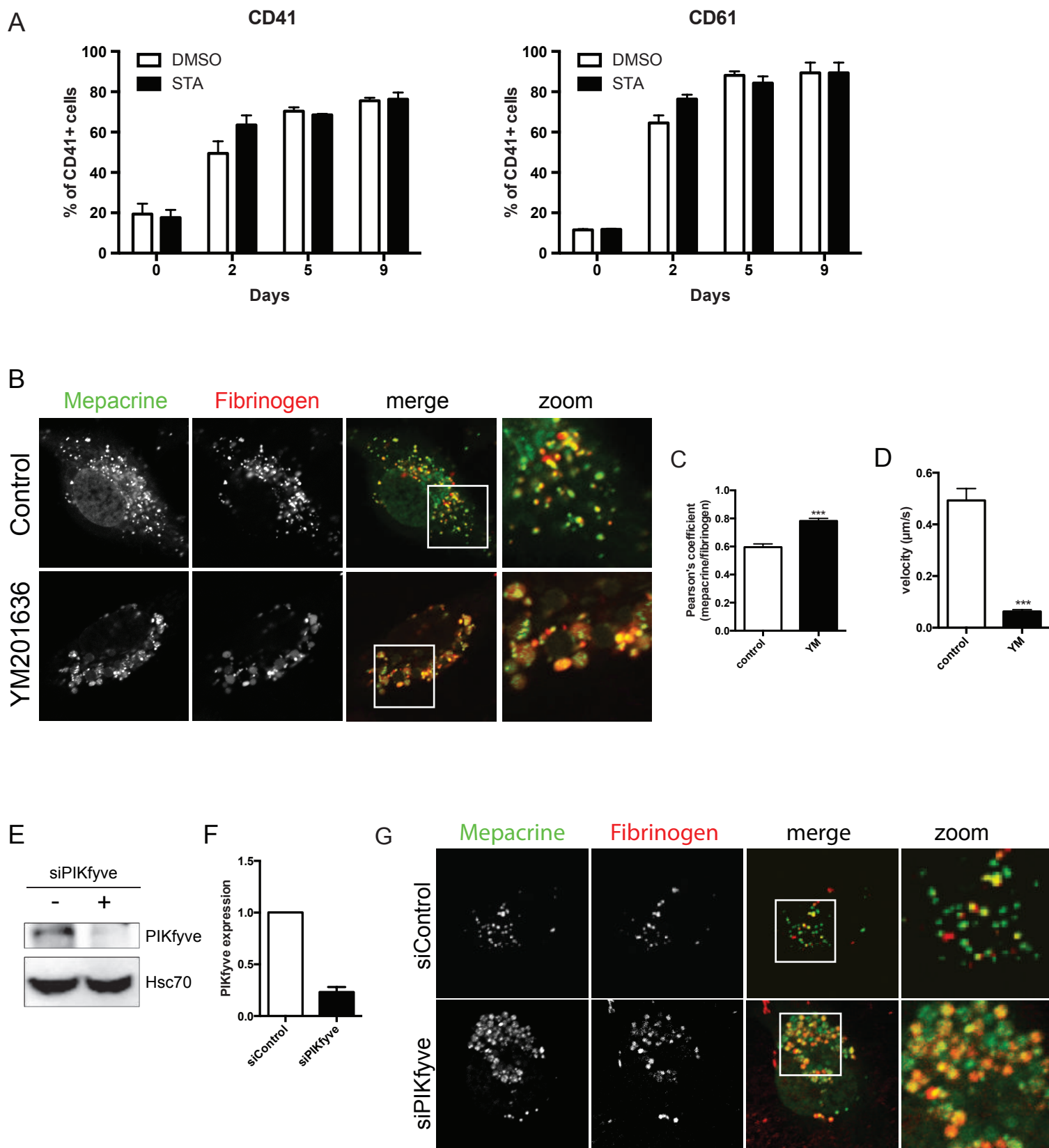
A



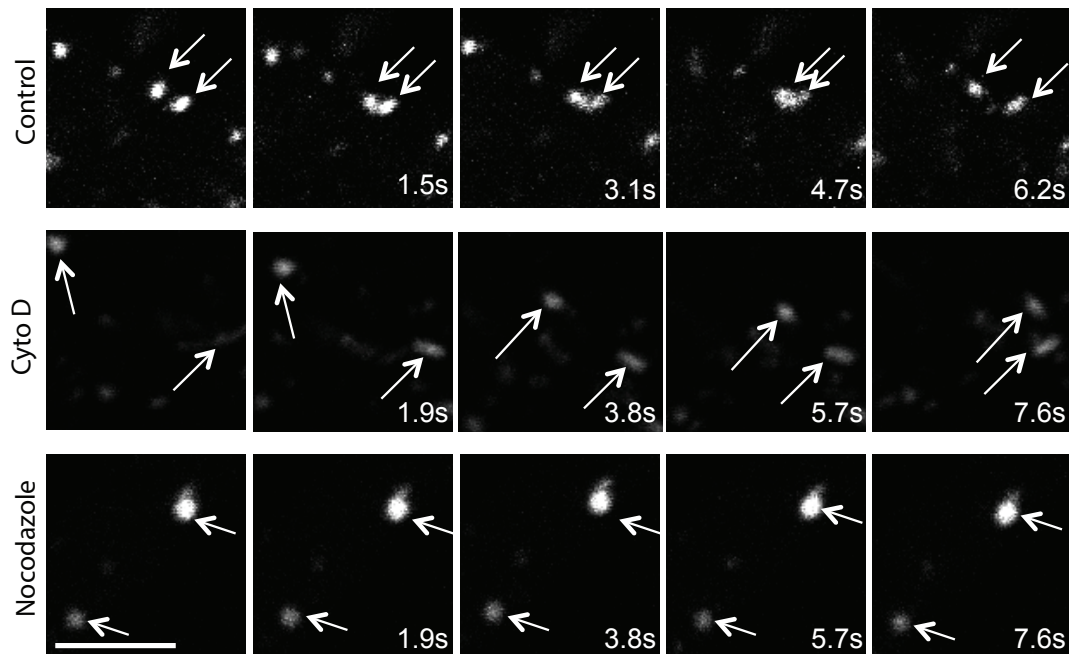
B



Supplemental figure 3



Supplemental figure 4



III. Conclusion :

Cette étude nous a permis de montrer l'implication de la kinase PIKfyve ainsi que de son produit le PtdIns5P dans la dynamique et l'intégrité des granules plaquettaires.

Nous montrons que le PtdIns5P est présent sur les compartiments endosomaux tardifs des MEG-01 ainsi que sur les granules denses et alpha. Nous mettons également en évidence le rôle majeur de PIKfyve dans la synthèse de PtdIns5P dans ce modèle. L'inhibition pharmacologique de PIKfyve par le STA5326 induit la formation de vésicules élargies dans les MEG-01 et les MK primaires. Cette inhibition altère l'identité des granules avec l'apparition de vésicules élargies comprenant des marqueurs des granules denses et des granules alpha. L'implication de PIKfyve est confirmée par l'utilisation de siRNA PIKfyve. De plus, nous montrons que PIKfyve joue également un rôle dans la mobilité des granules. Enfin, nous démontrons que l'effet de PIKfyve sur l'intégrité et la mobilité des granules implique le PtdIns5P.

Dans les plaquettes, l'inhibition de PIKfyve se traduit également par une perte d'identité des granules avec une augmentation de granules portant à la fois des marqueurs de granules denses et alpha. D'un point de vue fonctionnel, l'inhibition de PIKfyve affecte la sécrétion et l'agrégation des plaquettes. En effet, les plaquettes traitées par le STA5326 présentent une sécrétion d'ATP réduite. De même, la formation des thrombus mesurés en condition de flux sur matrice de collagène est significativement réduite. Ces résultats suggèrent un rôle de PIKfyve dans les mécanismes d'activations des plaquettes. Il sera maintenant important de confirmer ces résultats et de déterminer les mécanismes moléculaires mis en jeu par PIKfyve et le PtdIns5P.

IV. Résultats complémentaires

Mes travaux de thèse sont focalisés sur le rôle de la lipide kinase PIKfyve et l'un de ses produits, le PtdIns5P (produit à partir du PtdIns), dans l'identité des granules plaquettaires. Nous avons montré que PIKfyve joue un rôle majeur dans la maintenance de l'intégrité et la mobilité des granules et que les conséquences de son inhibition sont corrigées par addition du PtdIns5P alors que, comme le montre la figure 21, d'autres PI comme le PtdIns3P et le PtdIns4P n'ont aucun effet. Cependant, bien qu'*in vivo* aucune voie métabolique ne permettant la transformation du PtdIns5P en PtdIns(3,5)P₂ n'ai été décrite, *in vitro*, les PI 3-kinase de classe I sont capables de réaliser cette conversion. Nous ne pouvons donc pas totalement écarter cette hypothèse. De plus, le PtdIns(3,5)P₂ est aussi un produit de PIKfyve par phosphorylation du PtdIns3P. Comme nous l'avons évoqué dans la partie introductive le métabolisme des trois lipides, PtdIns3P, PtdIns(3,5)P₂ et PtdIns5P est étroitement lié. Nous avons donc cherché à savoir si le PtdIns(3,5)P₂ était capable du même effet que le PtdIns5P en restaurant l'intégrité et la mobilité des granules après inhibition de PIKfyve. Il n'existe pas de sonde sélective pour localiser le PtdIns(3,5)P₂ ce qui ne nous a pas permis de réaliser une étude poussée de ce PI dans les MK. Par contre, nous montrons que l'ajout du PtdIns(3,5)P₂ perméant, comme celle du PtdIns5P, sur des cellules MEG-01 où PIKfyve était inhibé entraîne une disparition des vésicules élargies et le retour à un phénotype normal. L'ajout du PtdIns3P et du PtdIns4P n'a eu aucun effet.

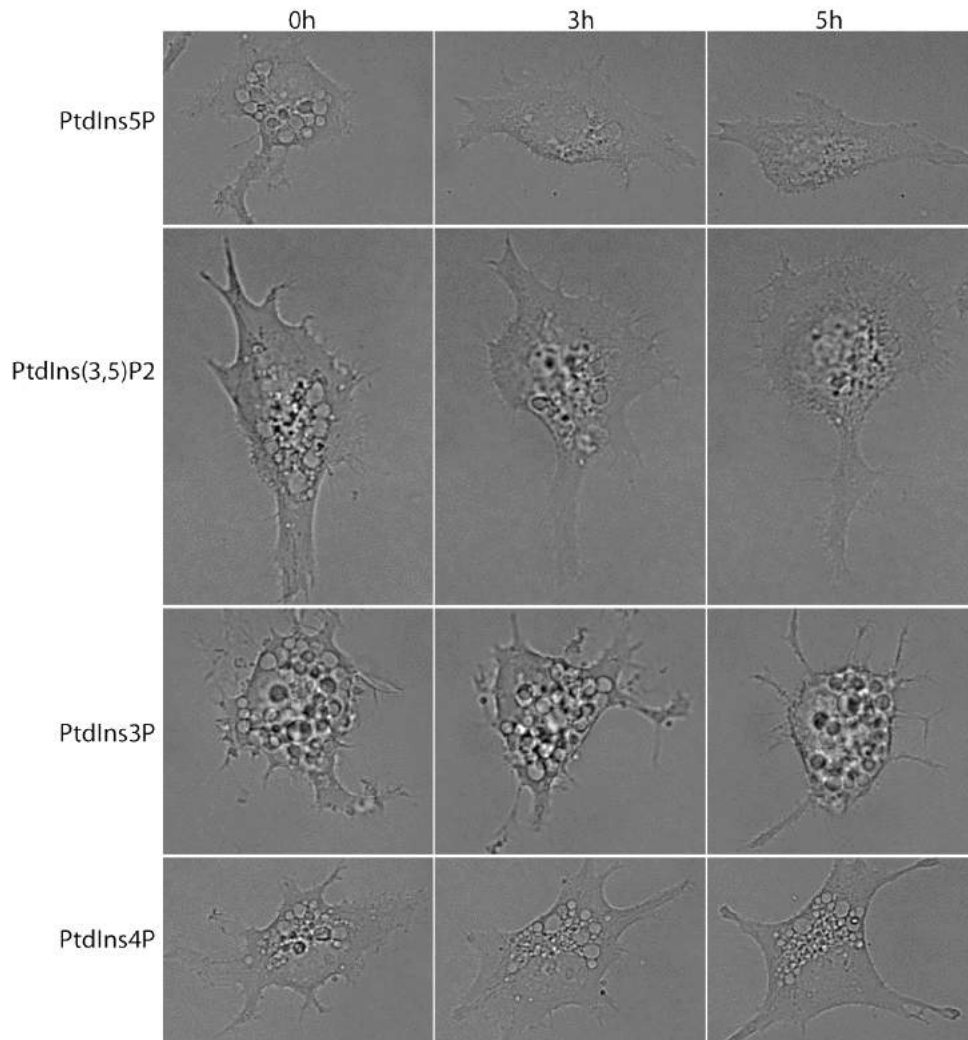


Figure 21 : Disparition des vésicules élargies par ajout de PtdIns(3,5)P₂ ou de PtdIns5P mais pas de PtdIns4P ou de PtdIns3P. Des cellules MEG-01 différenciées, traitées avec 200nM de STA5326 pendant la nuit puis lavées sont analysées par vidéomicroscopie. Avant le lancement de l’acquisition les PI indiqués sont ajoutés à une concentration de 25µM. Des images représentatives des films obtenus sont montrées après 3 et 5 h.

D’une façon intéressante, l’ajout simultané de faibles doses de PtdIns5P et de PtdIns(3,5)P₂ aboutit à une disparition encore plus rapide des vésicules élargies (Figure 22), ce qui suggère un lien étroit dans le métabolisme du PtdIns5P et du PtdIns(3,5)P₂. On ne peut pas exclure que le PtdIns(3,5)P₂ soit transformé en PtdIns5P par les lipides phosphatases de la famille des myotubularines, mais le fait que de très faibles doses d’un mélange de PtdIns5P et de

PtdIns(3,5)P₂ ait un effet aussi rapide et important suggère que ces deux PI sont impliqués dans le maintien et l'intégrité des granules plaquettaires. Il est vraisemblable que la balance métabolique qui gère les taux de ces deux PI et qui implique PIKfyve soit extrêmement bien régulée pour la maintenance de ces granules. Il sera donc intéressant d'envisager pour la suite de notre étude le rôle coopératif potentiel du PtdIns5P et du PtdIns(3,5)P₂ dans ce processus.

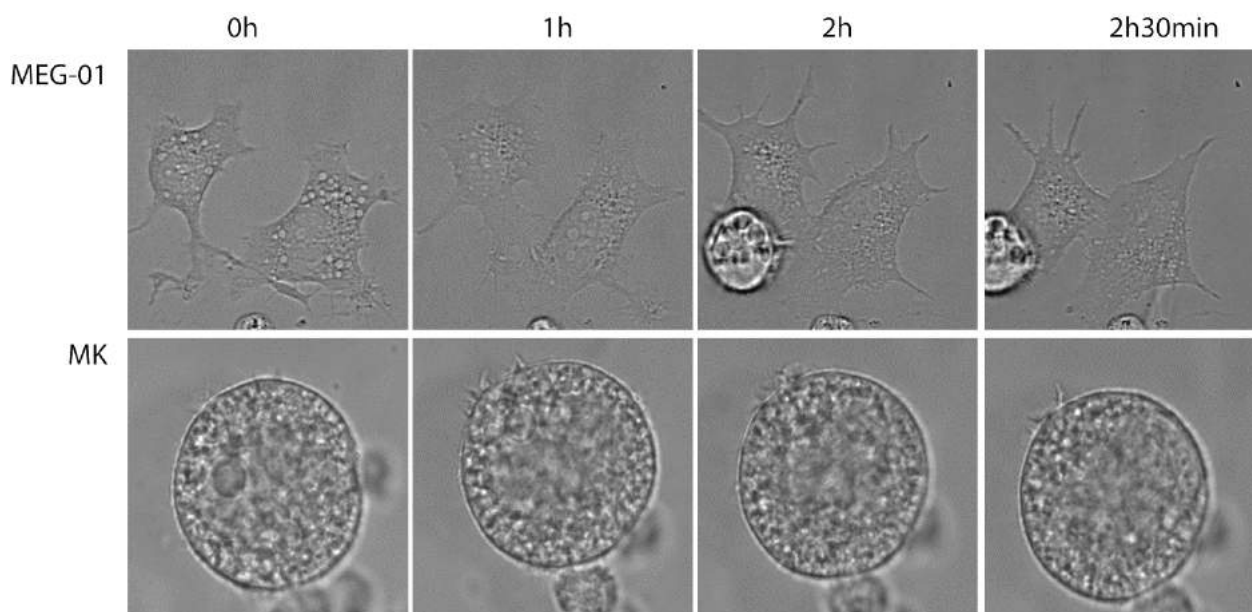


Figure 22 : La combinaison du PtdIns(3,5)P₂ et du PtdIns5P reverse rapidement le phénotype des vésicules élargies. Des cellules MEG-01 différenciées ou des MK primaires traitées avec 200nM ou 1μM respectivement de STA5326 pendant la nuit et lavées sont placées sous un vidéomicroscope. Avant le lancement de l'acquisition un mélange de 5μM de PtdIns5P et de 5μM PtdIns(3,5)P₂ a été ajouté aux cellules MEG-01 et de 10μM de chaque PI aux MK primaires de souris. Des images représentatives des films obtenus sont montrées après 1 h , 2 h et 2 h30.

Article 3 : TOM1 is a PI5P effector involved in the regulation of endosomal maturation

I. Contexte scientifique :

Le rôle du PtdIns5P dans le trafic vésiculaire a été démontré dans plusieurs travaux. Lors de l'infection bactérienne par la bactérie *Shigella flexneri*, plusieurs facteurs de virulence bactériens sont injectés dans la cellule hôte dont IpgD, qui est une puissante 4-phosphatase qui transforme le PtdIns(4,5)P₂ en PtdIns5P (Niebuhr et al., 2002). Le PtdIns5P produit en quantité importante au foyer d'entrée à la membrane plasmique induit une activation de la voie Akt, un mécanisme qui favorise la survie de la cellule hôte au profit du pathogène (ref). De plus, le PtdIns5P permet de modifier localement la dynamique du cytosquelette d'actine et de la membrane entraînant une activation du récepteur à l'EGF (EGFR) indépendamment de son ligand. Ce récepteur est rapidement endocytosé mais sa dégradation est bloquée par altération du trafic des protéines cargo des endosomes vers les lysosomes ce qui permet de maintenir des signaux de survie cellulaire à partir de l'EGFR dans des endosomes signalant (Ramel et al., 2011).

Dans ce travail, nous avons cherché à identifier les effecteurs du PtdIns5P sur les endosomes des cellules BHK. Cette étude nous a permis de montrer l'interaction du PtdIns5P avec une protéine adaptatrice TOM1 qui va réguler la maturation des endosomes, montrant ainsi le rôle du PtdIns5P dans le contrôle du trafic vésiculaire.

II. Article publié à Journal of Cell Science

TOM1 is a PI5P effector involved in the regulation of endosomal maturation

Frédéric Boal, Rana Mansour, Marion Gayral, Estelle Saland, Gaëtan Chicanne, Jean-Marie Xuereb, Marlène Marcellin, Odile Burlet-Schiltz, Philippe J. Sansonetti, Bernard Payrastra and
Hélène Tronchère

Journal of Cell Science (2015) 128, 815–827 doi:10.1242/jcs.166314

RESEARCH ARTICLE

TOM1 is a PI5P effector involved in the regulation of endosomal maturation

Frédéric Boal¹, Rana Mansour¹, Marion Gayral¹, Estelle Saland¹, Gaëtan Chicanne¹, Jean-Marie Xuereb¹, Marlène Marcellin^{2,3}, Odile Burlet-Schiltz^{2,3}, Philippe J. Sansonetti⁴, Bernard Payrastra^{1,5} and Hélène Tronchère^{1,*}

ABSTRACT

Phosphoinositides represent a major class of lipids specifically involved in the organization of signaling cascades, maintenance of the identity of organelles and regulation of multiple intracellular trafficking steps. We previously reported that phosphatidylinositol 5-monophosphate (PI5P), produced by the *Shigella flexneri* phosphatase IpgD, is implicated in the endosomal sorting of the epidermal growth factor receptor (EGFR). Here, we show that the adaptor protein TOM1 is a new direct binding partner of PI5P. We identify the domain of TOM1 involved in this interaction and characterize the binding motif. Finally, we demonstrate that the recruitment of TOM1 by PI5P on signaling endosomes is responsible for the delay in EGFR degradation and fluid-phase bulk endocytosis. Taken together, our data strongly suggest that PI5P enrichment in signaling endosomes prevents endosomal maturation through the recruitment of TOM1, and point to a new function of PI5P in regulating discrete maturation steps in the endosomal system.

KEY WORDS: EGFR, Phosphoinositides, Signaling endosome, TOM1, VHS domain

INTRODUCTION

The endocytic route is a complex and tightly regulated pathway. It serves as a sorting platform to differentiate cargoes coming from the cell surface or the extracellular medium and to target them for recycling, retrograde transport or degradation (Huotari and Helenius, 2011). This pathway consists of a succession of discrete compartments, and our understanding of this pathway has evolved rapidly in recent years. The canonical route involves the formation of early endosomes, their maturation into late endosomes and fusion with lysosomes to mediate the degradation of their contents. In this classical pathway, newly internalized cell-surface receptors are thought to be rapidly inactivated in early endosomes to downregulate their signaling. This paradigm has been challenged by the characterization of specific early endosomes, termed signaling endosomes, where signaling from a variety of receptors can continue and even be amplified along the

endocytic route (Di Fiore and De Camilli, 2001; Miaczynska et al., 2004; von Zastrow and Sorkin, 2007; Zoncu et al., 2009). This transient APPL1-positive compartment is common to clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. Upon maturation, these signaling endosomes are converted into classical early endosomes where the signaling of receptors is terminated.

Given the dynamic nature of this compartment, tight regulation is needed to maintain the identity of these organelles. Among the regulatory factors, lipids from the phosphoinositide family are now recognized as master regulators of this route (Di Paolo and De Camilli, 2006; Jean and Kiger, 2012). They are able to recruit specific effectors on the cytosolic face of organelles and coordinate a vast variety of signaling and trafficking processes (Lemmon, 2003; Di Paolo and De Camilli, 2006; Clague et al., 2009). As an example, phosphatidylinositol 3-monophosphate (PI3P) and phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate [PI(3,5)P₂], which reside mainly on endocytic compartments, are well known regulators of vesicular trafficking and autophagy that function by recruiting proteins harboring phosphoinositide-binding modules (Balla, 2013). Not much is known about one of the least identified phosphoinositides, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PI5P), which is present at low concentrations in cell membranes. However, in recent years, new findings have helped to clarify the function of PI5P in cells. In the nucleus, in response to stress signaling (Jones et al., 2006), PI5P acts as a regulator of chromatin organization and gene expression through its interaction with the PHD (plant homeodomain) domain-containing protein ING2 (Gozani et al., 2003). Outside the nucleus, PI5P has been shown to be implicated in the regulation of membrane dynamics and trafficking (Shisheva, 2013; Viaud et al., 2014a). In this context, three potential pathways lead to an increase in the amount of PI5P: one involves the direct phosphorylation of phosphatidylinositol by the 5-kinase PIKfyve, the second involves a PI3P–PI(3,5)P₂–PI5P route with the concerted action of the PIKfyve and the 3-phosphatases of the myotubularin family (Viaud et al., 2014a) and the third uses PI(4,5)P₂ as a source of PI5P. This latter pathway was originally described in cells infected with the bacterium *Shigella flexneri*, through the injection of the virulence factor IpgD, a PI(4,5)P₂ 4-phosphatase (Niebuhr et al., 2002). Upon infection with the pathogen, or expression of the bacterial lipid phosphatase, this primary pool of PI5P at the plasma membrane has been shown to induce membrane remodeling and activation of the Akt survival pathway (Niebuhr et al., 2002; Pendaries et al., 2006), to control the modulation of hemichannel opening (Puhar et al., 2013) and to alter the endocytic pathway (Ramel et al., 2011). Namely, increased levels of PI5P induce epidermal growth factor receptor

¹INSERM U1048, I2MC and Université Paul Sabatier, 31432 Toulouse, France. ²CNRS; IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France. ³Université de Toulouse; UPS; IPBS; F-31077 Toulouse, France. ⁴INSERM U786, Unité de Pathogénie microbienne moléculaire, Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France. ⁵CHU de Toulouse, Laboratoire d'Hématologie, 31059 Toulouse Cedex 03, France.

*Author for correspondence (helene.tronchere@inserm.fr)

(EGFR) activation independently of its ligand and impair the maturation of early endosomes to late endosomes, delaying the degradation of EGFR to maintain survival signals. PI5P also blocked the bulk endocytosis of fluid-phase markers like dextran, without altering the recycling or the endosome-to-TGN (trans-Golgi network) retrograde pathways (Ramel et al., 2011). As IpgD expression induced a rise in the amount of PI5P on endosomes (Ramel et al., 2011), we speculated that this blockade could be explained by the enrichment of a specific PI5P effector on endosomes, and undertook a fishing proteomic approach to characterize new PI5P effectors that could be responsible for this phenotype. Here, we unravel a new PI5P effector, the protein adaptor TOM1, and show that PI5P-dependent TOM1 recruitment to signaling endosomes blocks endosomal maturation.

RESULTS

TOM1 is enriched on signaling endosomes in IpgD-expressing cells

In order to characterize new PI5P effectors and gain insight into the molecular mechanisms involved in the blockade of endosome maturation induced by PI5P enrichment, we undertook

a proteomic approach on purified early endosomes from control cells or those overexpressing IpgD (PI5P-endosomes). We used a previously described method to separate the early endosomes from the late endosomes on a discontinuous sucrose gradient (Gorvel et al., 1991). Supplementary material Fig. S1A shows the characterization of these fractions with endosomal markers. The purified endosomes were subjected to mass-spectrometric analysis and the relative enrichment of proteins was quantified. Among the hits, the protein TOM1 [target of myb-1 (chicken)] appeared to be a candidate of particular interest, as it was enriched 4.1-fold in PI5P-endosomes compared with control early endosomes (Fig. 1A, upper panel). TOM1 is a 492-residue protein composed of different characterized domains (Fig. 1A, middle panel). It contains a VHS (Vps27-Hrs-STAM) domain and a GAT (GGA and TOM1) domain, both of which are found on several proteins involved in trafficking steps (Bonifacino, 2004; Wang et al., 2010), and a clathrin binding box (Seet and Hong, 2005; Katoh et al., 2006). The two peptides that allowed identification of TOM1 are found in neither of the two TOM1 subfamily members TOM1L1 and TOM1L2 (Fig. 1A, lower panel). In order to confirm this result, we immunoblotted purified

A

Name	Access numb	PAI ratio	Peptides
Target of myb1 homolog (Chicken) TOM1	Q5XI21	4.1	¹ MDFLLGNPFSSPVGQR ¹⁰ ¹¹⁷ VLNLIQSWADAFR ¹²⁹

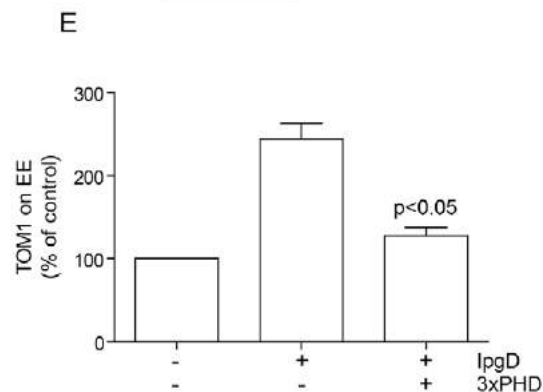
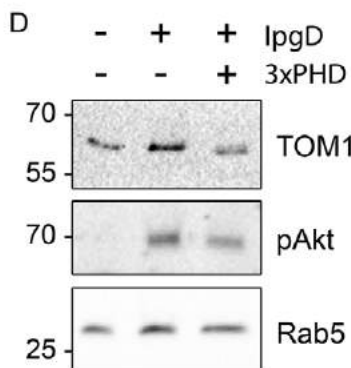
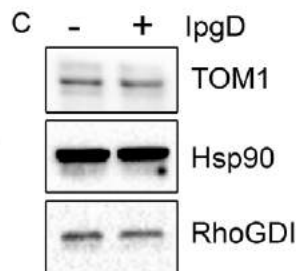
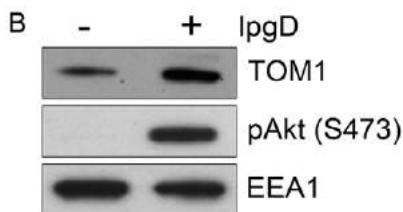
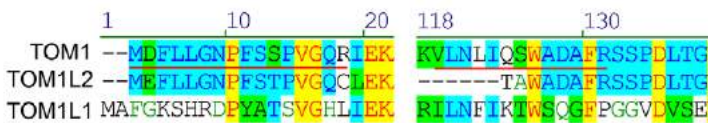
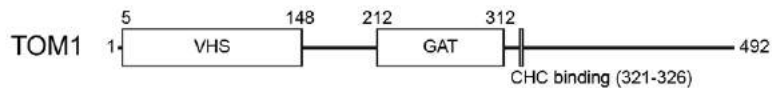


Fig. 1. TOM1 is enriched on early endosomes in IpgD-expressing cells.

(A) Upper panel, mass spectrometric analysis results for TOM1. The access number for TOM1 is shown; PAI ratio reflects the enrichment of TOM1 on early endosomes in IpgD-expressing cells versus control cells; right column shows the sequence of the two peptides identified by LC-MS/MS analysis. Middle panel, human TOM1 structural domains showing the VHS and GAT domains and the clathrin heavy chain binding region (CHC binding). Numbering of residues is shown. Lower panel, sequence alignment of human sequences for TOM1 and the two closely related isoforms, TOM1L2 and TOM1L1, showing the specificity of the two peptides identified by mass spectrometric analysis (underlined in red). (B) Early endosomes from BHK control cells or cells expressing IpgD were purified on a discontinuous sucrose gradient, and proteins were loaded on SDS-PAGE gel and immunoblotted using the antibodies indicated on the right. pAKT, phosphorylated AKT. (C) The overall expression level of TOM1 is not altered by IpgD expression. Post-nuclear supernatants of BHK cells with or without expression of IpgD were immunoblotted with the indicated antibodies. Hsp90 and RhoGDI were used as loading controls. (D) Overexpression of 3xPHD displaces TOM1 from PI5P-endosomes. Early endosomes were purified as in B from BHK cells expressing IpgD and 3xPHD, and were blotted for TOM1, pAkt (S473) and Rab5. (E) Quantification of TOM1 recruitment to early endosomes (EE) from D. Data show the mean \pm s.e.m. ($n=3$).

early endosomes from control or IpgD-expressing baby hamster kidney (BHK) cells. As shown in Fig. 1B, IpgD induced activation of Akt (monitored by the phosphorylation of the S473 residue) and its accumulation on PI5P-endosomes, as we have described previously in other cell types (Pendaries et al., 2006; Ramel et al., 2011). As nuclear PI5P was shown to regulate gene expression (Gozani et al., 2003; Bua et al., 2013), we verified that TOM1 augmentation was indeed due to the recruitment of the protein to endosomes and not to an increase in its expression level by blotting TOM1 on a total cell lysate (Fig. 1C).

Finally, to demonstrate that the binding of TOM1 to PI5P was responsible for its recruitment to endosomes in IpgD-expressing cells, we sequestered PI5P with the 3xPHD probe, a well-characterized competitor for PI5P binding (Gozani et al., 2003). Expression of the 3xPHD probe interfered with TOM1 recruitment to the endosomes (Fig. 1D,E). We also observed a decrease in the activation of Akt, as monitored by the phosphorylation of S473 (Fig. 1D, $38.33 \pm 3.66\%$; $\text{mean} \pm \text{s.e.m.}$). The overall expression level of TOM1 was not altered in the post-nuclear supernatant (supplementary material Fig. S1B).

EGFR is internalized to TOM1-positive signaling endosomes in IpgD-expressing cells

The precise localization of TOM1 in the endosomal system is quite debated in the literature. Indeed, TOM1 has been shown to be recruited, through its interaction with endofin (also known as ZFYVE16) or TOLLIP, to EEA1-positive endosomes (Kato et al., 2004; Seet et al., 2004; Seet and Hong, 2005) or to a later endosomal compartment (Brissoni et al., 2006). More recently, TOM1 has been reported to colocalize with the protein GIPC (Tumbarello et al., 2012), a specific marker of signaling endosomes (Varsano et al., 2006). The antibody that we used to detect TOM1 by western blotting was inefficient for immunofluorescence studies; therefore, we turned to an antibody directed against the closely related isoform TOM1L2, as others did recently (Tumbarello et al., 2012). In our hands, both in human HeLa cells and in mouse embryonic fibroblast (MEF) cells, this antibody detects a single band at the expected size for TOM1 (~60 kDa), and this band is specifically depleted in cells transfected with a small interfering (si)RNA specifically directed against TOM1 (supplementary material Fig. S1C,F; quantification in Fig. S1D,G). Consistent with what was reported previously for overexpressed and endogenous TOM1 (Kato et al., 2004; Seet et al., 2004; Seet and Hong, 2005; Brissoni et al., 2006; Tumbarello et al., 2012), this antibody gave a punctate vesicular staining by immunofluorescence. This staining was greatly reduced upon knockdown of TOM1 by siRNA (supplementary material Fig. S1E), demonstrating the specificity of this signal. Therefore, this antibody was further used to determine the localization of TOM1 by immunofluorescence. As shown in Fig. 2A, in MEF cells, TOM1 was localized on peripheral vesicles. Interestingly, only a minor fraction of these vesicles colocalized with EEA1, whereas a stronger colocalization was observed with GIPC. Quantification of the colocalization using the Pearson's coefficient (Fig. 2B) clearly showed that colocalization between TOM1 and EEA1 is indeed low (2.7% of colocalization), whereas the colocalization between TOM1 and GIPC is much higher (32.6%). Interestingly, expression of IpgD does not change the Pearson's coefficients (Fig. 2B), which is consistent with a recruitment of TOM1 to signaling endosomes and not a change in its localization.

Given this, we hypothesized that TOM1 would be recruited to signaling endosomes together with internalized EGFR in IpgD-expressing cells. In control cells, overexpressed EGFR fused to GFP localized mainly at the plasma membrane (Fig. 2C, Control). In IpgD-expressing cells, as we described previously for endogenous EGFR (Ramel et al., 2011), EGFR–GFP was internalized to vesicular structures positive for both TOM1 and GIPC (Fig. 2C; IpgD and highlighted in zoomed boxes in Fig. 2D). Quantification of the colocalization between TOM1 and EGFR–GFP is shown in Fig. 2E. Overall, these results show that EGFR is retained in signaling endosomes that are positive for both TOM1 and GIPC when IpgD is expressed in cells.

The VHS domain of TOM1 binds to phosphoinositides *in vitro*

An interesting possibility to explain TOM1 recruitment to PI5P-endosomes would be through a direct interaction with the phosphoinositide. In order to test this possibility, we resorted to lipid overlay experiments using PIP Strips™. Consistent with results obtained with *Dictyostelium discoideum* DdTOM1, the only VHS-domain-containing protein in the amoeba (Blanc et al., 2009), we found that the VHS domain of the human TOM1 interacted with the phosphatidylinositol monophosphates (Fig. 3A, VHS). Phosphatidylinositol bisphosphates and phosphatidylinositol trisphosphates were not recognized or were very weakly recognized, indicating that the interaction with phosphatidylinositol monophosphates was specific and not only based on an accumulation of negative charges. In order to compare the relative avidity of this domain to different phosphatidylinositol monophosphates, we used PIP Arrays™. The VHS domain of TOM1 showed a greater avidity for PI5P compared with the other phosphatidylinositol monophosphates, with as little as 25 pmol detected (Fig. 3B, VHS). This is in contrast to DdTOM1, which showed a clear preference for PI3P and no binding to PI5P (Blanc et al., 2009). Preferential binding of the VHS to PI5P was further confirmed in a liposome flotation assay with liposome containing phosphatidylcholine:phosphatidylethanolamine and PI3P, PI4P or PI5P (Fig. 3C).

We next investigated the residues involved in this interaction. The structure of the VHS domain has been solved, and the authors proposed that a patch of positively charged residues mediate potential interaction with membranes (supplementary material Fig. S2A) (Misra et al., 2000). In order to verify this hypothesis, we mutated these residues (K48, R52, K58 and K59) into alanine, yielding the KRKK mutant. Strikingly, these mutations greatly reduced the binding to phosphatidylinositol monophosphates as assessed by lipid overlay assays (Fig. 3A,B, VHS KRKK) and completely abolished the preference towards PI5P in the liposome binding assay (Fig. 3C). We also tested the affinity of the GAT domain of TOM1 for phosphoinositides. As shown in supplementary material Fig. S2B, the TOM1 GAT domain showed a slight preference for PI5P over PI3P and PI4P. However, in the liposome flotation assay, this preference was not confirmed across four independent experiments (supplementary material Fig. S2C). Therefore, we concluded that the GAT domain of TOM1 is not a strong interactor of PI5P. Taken together, these results show that the TOM1 VHS domain preferentially binds to PI5P through the KRKK motif. The existence of this PI5P-binding module on the protein and the fact that IpgD expression yields high levels of PI5P in cells (Niebuhr et al., 2002), and in particular on endosomes (Ramel et al.,

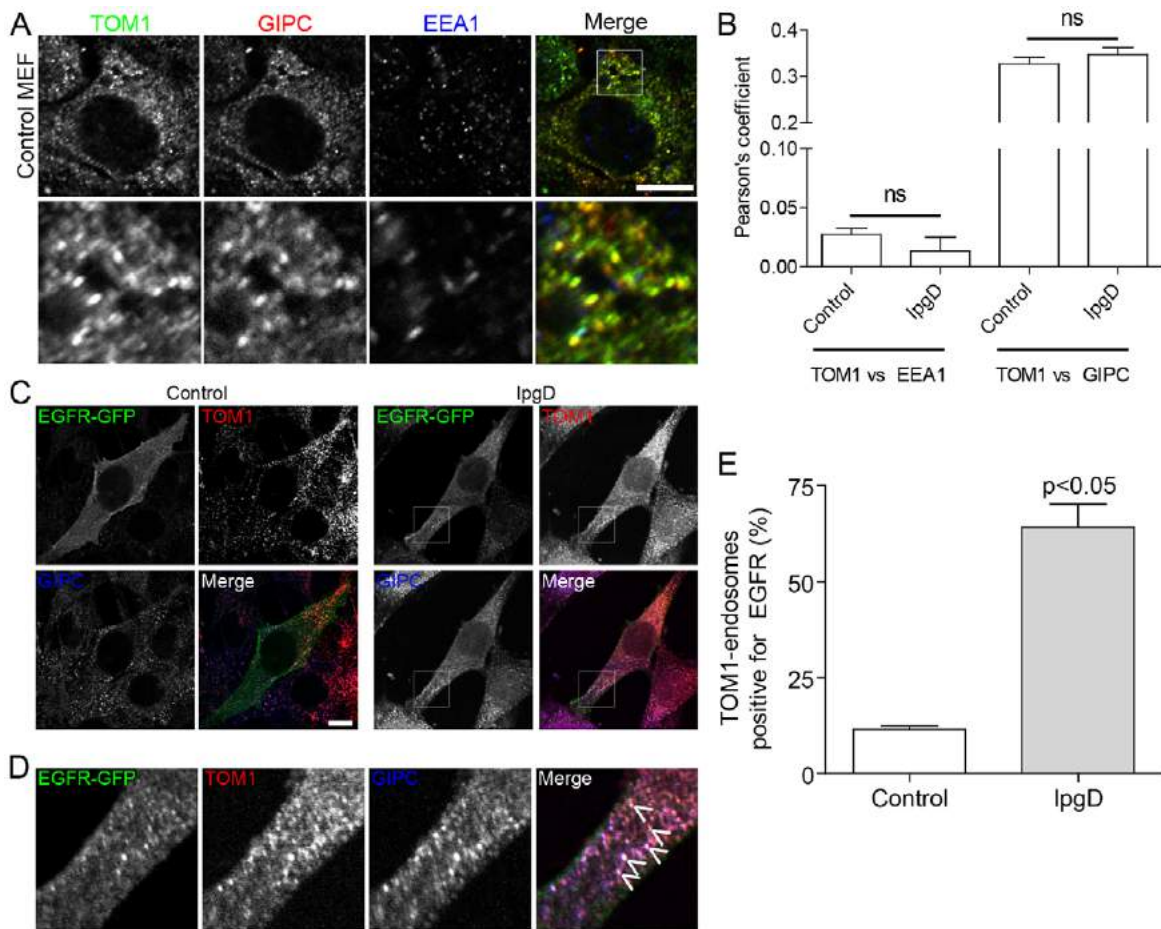


Fig. 2. TOM1 is enriched on signaling endosomes positive for EGFR in IpgD-expressing cells. (A) Control MEF cells were fixed and immunostained using the indicated antibodies to assess the localization of TOM1. (B) Pearson's coefficient assessing the colocalization between TOM1 and EEA1 on one hand and TOM1 and GIPC on the other hand was calculated for control MEFs or in MEFs expressing IpgD. ns, nonsignificant differences between the indicated conditions (Student's *t*-test). Data show the mean \pm s.e.m. ($n=3$, representing 92–121 cells). (C) Control or MEF cells stably expressing IpgD were transfected to express EGFR–GFP, serum-starved for 3 h in the presence of cycloheximide, fixed and stained for endogenous TOM1 (red in merge) and GIPC (blue in merge). Scale bars: 10 μ m. (D) Enlarged boxes from the IpgD-expressing cell shown in C. Arrowheads indicate EGFR–GFP internalized in TOM1- and GIPC-positive endosomes. (E) Quantification of TOM1–EGFR colocalization in control or IpgD-expressing cells. Individual endosomes positive for TOM1 and EGFR were counted in control cells or IpgD-expressing cells. Data show the mean \pm s.e.m. ($n=3$, representing 30–60 cells). $P<0.05$ (Student's *t*-test).

2011), are consistent with the PI5P-dependent recruitment of TOM1 to endosomes in IpgD-expressing cells.

TOM1 is not an ESCRT-associated protein for EGFR degradation

TOM1 has been proposed to be part of an endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT)-0 complex (Brissoni et al., 2006; Blanc et al., 2009). It was therefore very tempting to postulate that TOM1 would serve as an ESCRT-associated protein, in particular for the regulation of EGFR degradation. To investigate this, we resorted to siRNA-mediated depletion of TOM1 in cells and stimulation with EGF. No effect of TOM1 depletion on EGFR degradation was found either biochemically (supplementary material Fig. S3A) or by immunofluorescence (supplementary material Fig. S3B), indicating that TOM1 does not act as an ESCRT-associated protein for EGFR degradation induced by EGF stimulation. Therefore, we postulated that PI5P enrichment on signaling endosomes might cause an accumulation of TOM1 on these structures and might represent the reason for the delayed EGFR degradation specifically in IpgD-expressing cells.

TOM1 recruitment to PI5P-endosomes is responsible for the delayed EGFR degradation in IpgD-expressing cells and the maintenance of cell survival

In order to study the potential role of TOM1 in EGFR trafficking in IpgD-expressing cells, we resorted to an immunofluorescence study to track the degradation of EGFR following EGF stimulation in IpgD-expressing cells. Cells were transfected with either a control siRNA (Fig. 4, siControl) or with a siRNA targeting TOM1 (Fig. 4, siTOM1), and were then transiently transfected to express GFP or GFP–IpgD. After serum starvation, the cells were stimulated with EGF or left unstimulated, fixed and stained with an anti-EGFR antibody. Semi-quantitative confocal imaging was performed, and the intensity of EGFR signal per cell was quantified, reflecting the amount of remaining receptor per cell. As anticipated, in control unstimulated cells, EGFR was restricted to the plasma membrane (Fig. 4A, siControl, –EGF). When stimulated with EGF, the signal for EGFR was lost, as a consequence of its lysosomal degradation. Quantitatively, this resulted in a decrease to $41.20 \pm 2.47\%$ (compared with control cells $101 \pm 4.2\%$, Fig. 4C; mean \pm s.e.m.). As expected, IpgD expression induced

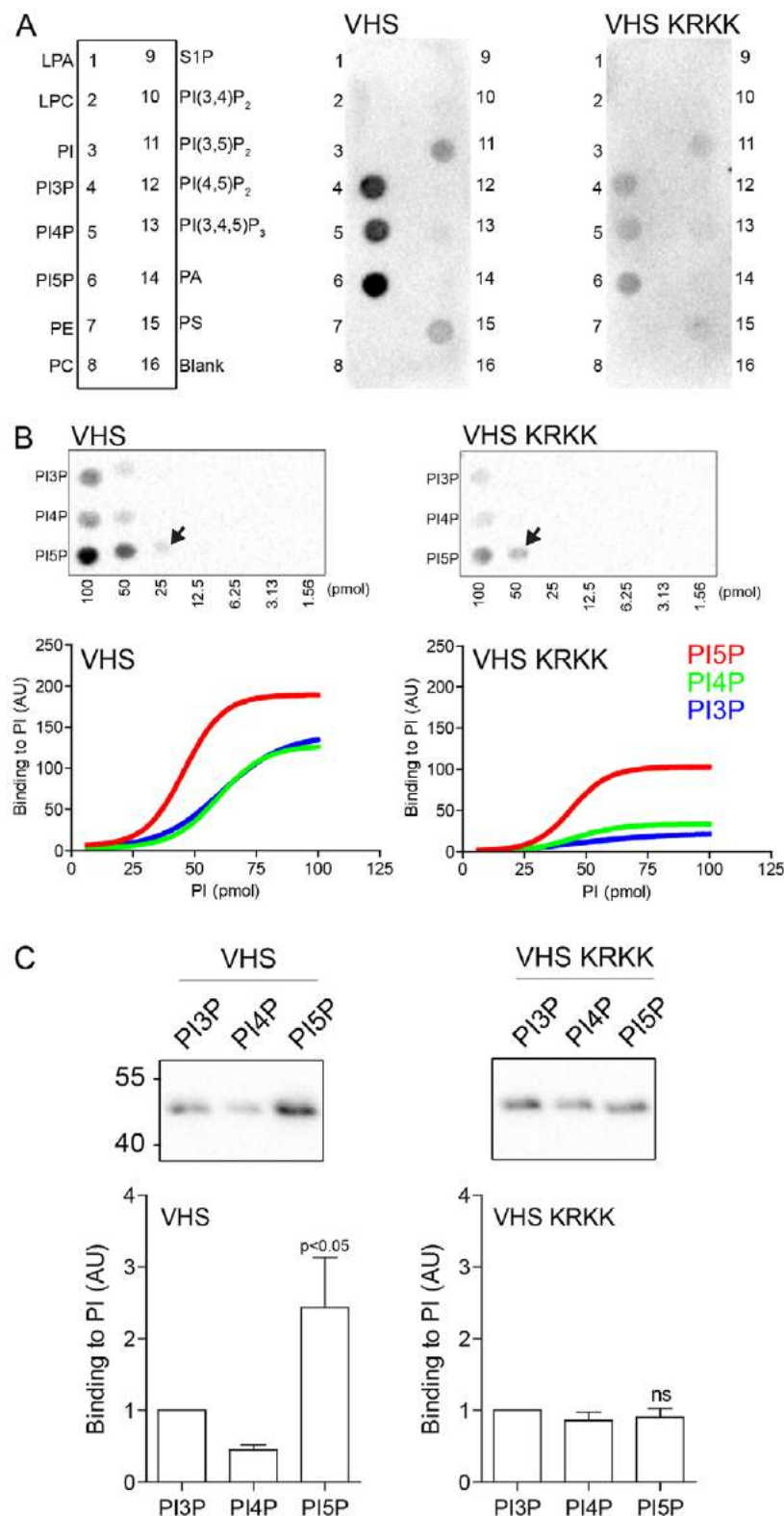


Fig. 3. The VHS domain of TOM1 binds to monophosphorylated phosphatidylinositol with a preference for PI5P. (A) The indicated recombinant proteins were used to probe PIP Strips™. After extensive washes, bound proteins were revealed using an anti-GST antibody. LPA, lysophosphatidic acid; LPC, lysophosphatidylcholine; PI, phosphatidylinositol; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; S1P, sphingosine-1-phosphate; PA, phosphatidic acid; PS, phosphatidylserine. (B) Same as in A but proteins were incubated on PIP Arrays™ (upper panel). Arrows indicate the lowest concentration of binding to PI5P of each protein. The lower panels show typical curve fitting for the interaction of each domain with the indicated phosphatidylinositol. AU, arbitrary units. (C) Wild-type or KRKK-mutant VHS domains of TOM1 were incubated with phosphatidylcholine:phosphatidylethanolamine liposomes containing 6% of the indicated monophosphorylated phosphatidylinositol. After flotation on a sucrose cushion, the top fractions were collected and the amount of lipid-bound protein was assessed by western blotting (upper panels). Quantification is shown in the lower panels as the mean \pm s.e.m. from three independent experiments. ns, nonsignificant (Student's *t*-test).

EGFR internalization, but did not alter the amount of total EGFR per cell ($95.31 \pm 5.56\%$).

By contrast, in IpgD-expressing cells, in the presence of control siRNA, EGFR degradation was delayed as we published previously (Ramel et al., 2011), with $65.5 \pm 2.3\%$ remaining EGF (compared with $41.20 \pm 2.47\%$ in control EGF-stimulated

cells, Fig. 4B,C; mean \pm s.e.m.). Strikingly, cells overexpressing IpgD and depleted for TOM1 showed a reduction in EGFR level after EGF challenge ($35 \pm 4\%$), back to the level of the control. This clearly indicated that TOM1 accumulation is crucial for the blockade of EGFR degradation induced by IpgD. Finally, treating the cells with the lysosomal inhibitor bafilomycin A1 abrogated

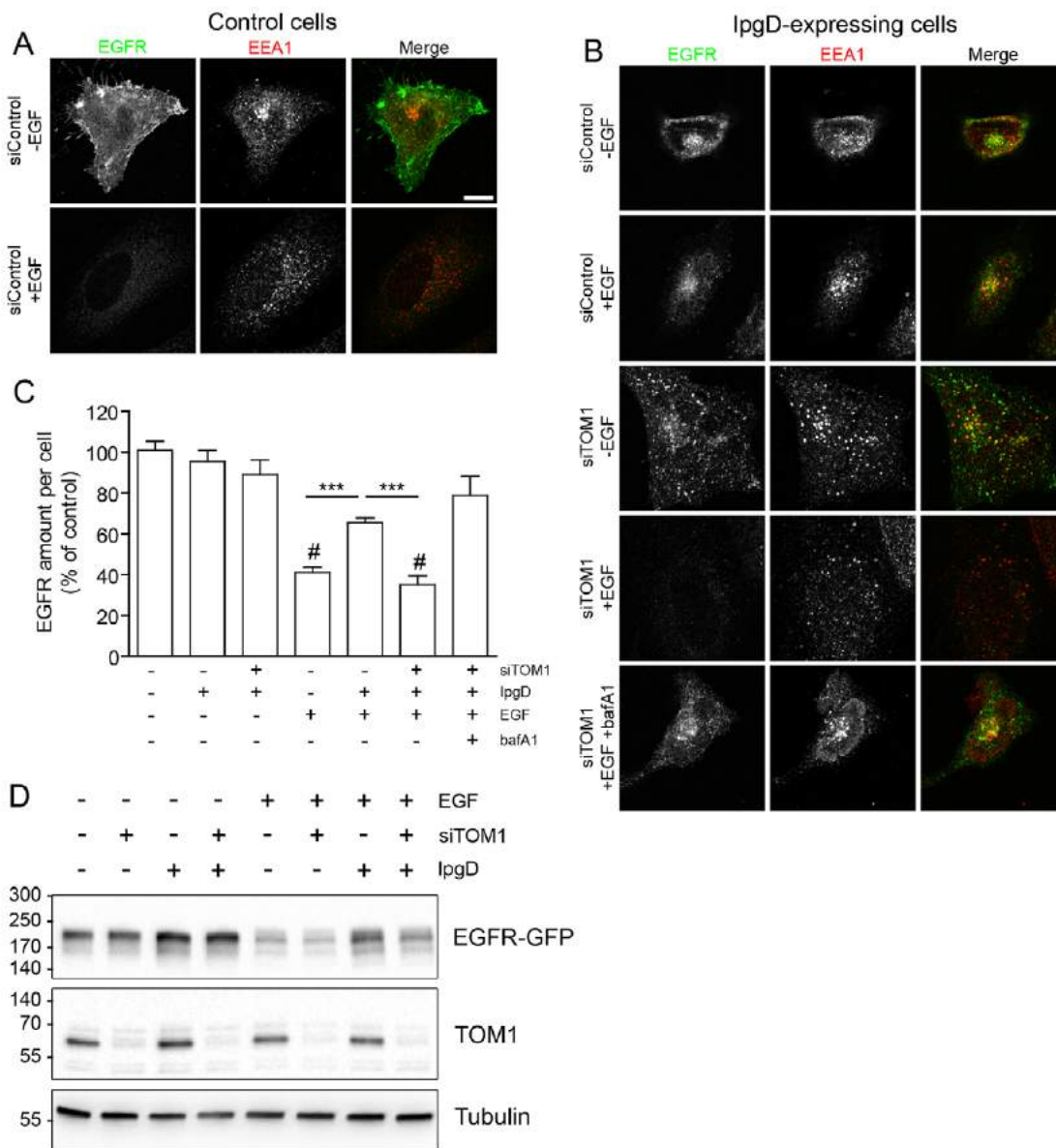


Fig. 4. TOM1 knockdown reverses delayed EGFR degradation in IpgD-expressing cells. (A,B) HeLa cells were transfected with a control siRNA (siControl) or siRNA against TOM1 (siTOM1) and transiently expressed GFP (Control cells) or GFP-IpgD (IpgD-expressing cells). The cells were then serum-starved and left untreated (-EGF) or stimulated with 200 ng/ml EGF for 1 h (+EGF), in the absence or presence (+bafA1) of 100 nM bafilomycin A1 to inhibit lysosomal degradation. Cells were then fixed and stained for endogenous EGFR (green in merge) and EEA1 (red in merge) and imaged by confocal microscopy. Scale bars: 10 μ m. (C) The amount of EGFR per cell was quantified and expressed as a percentage of that present in the control. Results are presented as the mean \pm s.e.m. (three independent experiments). [#] $P < 0.0001$ versus control cells; ^{***} $P < 0.0001$ between the indicated conditions (Student's *t*-test). (D) HEK293T cells transfected with EGFR-GFP and IpgD as indicated were silenced for TOM1 expression (siTOM1), serum-starved and stimulated with EGF (100 ng/ml) for 2 h. Cell lysates were probed with the indicated antibodies.

EGFR degradation under all conditions (for clarity, only one bafilomycin A1 condition is shown in Fig. 4B). These results were confirmed biochemically in HEK293T cells transiently overexpressing EGFR-GFP to monitor its degradation upon EGF stimulation. However, when cells expressed IpgD, we observed a retarded EGFR-GFP degradation. Strikingly, this delay was completely abolished when the cells were silenced for TOM1 expression (Fig. 4D).

Among the described interacting partners of TOM1, endofin has been proposed to play a role in the degradation of EGFR (Seet and Hong, 2001). To investigate whether endofin was also involved, we knocked it down with a specific siRNA. This

resulted in a 65% mRNA expression decrease as measured by qRT-PCR (supplementary material Fig. S3C) and a 40% decrease at the protein level (supplementary material Fig. S3D,E). As shown in supplementary material Fig. S3F, we could not detect any role for endofin in the retarded EGFR degradation in IpgD-expressing cells. This clearly indicates that TOM1 itself, and not its partner endofin, is involved in the regulation of EGFR degradation in IpgD-expressing cells.

Given the fact that TOM1 knockdown in IpgD-expressing cells prevents the blockade in EGFR degradation, we wanted next to investigate whether this could perturb the survival signals downstream of EGFR. As shown in supplementary

material Fig. S4, knocking down TOM1 indeed reversed PI5P-induced Akt activation, as monitored by S473 phosphorylation.

Overexpression of wild-type TOM1 but not of the TOM1-KRKK mutant restores the inhibition of endocytosis

We showed previously that IpgD expression was also inhibiting fluid-phase bulk endocytosis, as demonstrated by fluorescently labeled dextran uptake (Ramel et al., 2011). In order to confirm whether TOM1 depletion in cells was abrogating this effect, we performed an IgG-uptake experiment, as described elsewhere (Petiot et al., 2003). In control MEF cells not expressing IpgD, internalized IgG was sent to degradation with no remaining signal detected by immunofluorescence compared with bafilomycin-A1-treated cells (Fig. 5A, quantification in Fig. 5B). In IpgD-expressing cells, IgG uptake clearly demonstrated a delayed degradation of IgG, with close to 40% of IgG left. Strikingly, TOM1-depletion completely reversed the phenotype, with no detectable IgG left in these cells. Again, knocking down TOM1 alone did not have any effect on IgG degradation, as we showed for EGFR degradation.

In order to confirm a crucial role of TOM1 in endocytosis blockade in IpgD-expressing cells, we resorted to a recovery experiment. We used siRNA targeting the 3'-UTR region of TOM1 to deplete the protein in control or IpgD-expressing MEF cells, and then overexpressed either the wild-type or KRKK mutant of TOM1 as a GFP fusion protein. The efficiency of siRNA and overexpression was assessed by immunoblotting, as shown in supplementary material Fig. S2D and quantified in supplementary material Fig. S2E. We used the IgG uptake assay to investigate whether overexpression of wild-type or KRKK TOM1 was able to restore the phenotype. As shown in Fig. 6, overexpression of wild-type TOM1 clearly reversed the knockdown phenotype by restoring the blockade in bulk endocytosis induced by IpgD expression, although not completely. It has to be noted that in these experiments, the controls gave undistinguishable results from the ones in Fig. 5. Strikingly, overexpression of the KRKK mutant was not able to restore the phenotype, even at a high expression level (an example is shown in Fig. 6A). These results confirm that PI5P binding to the VHS domain is required for TOM1 to block endocytosis in PI5P-enriched cells.

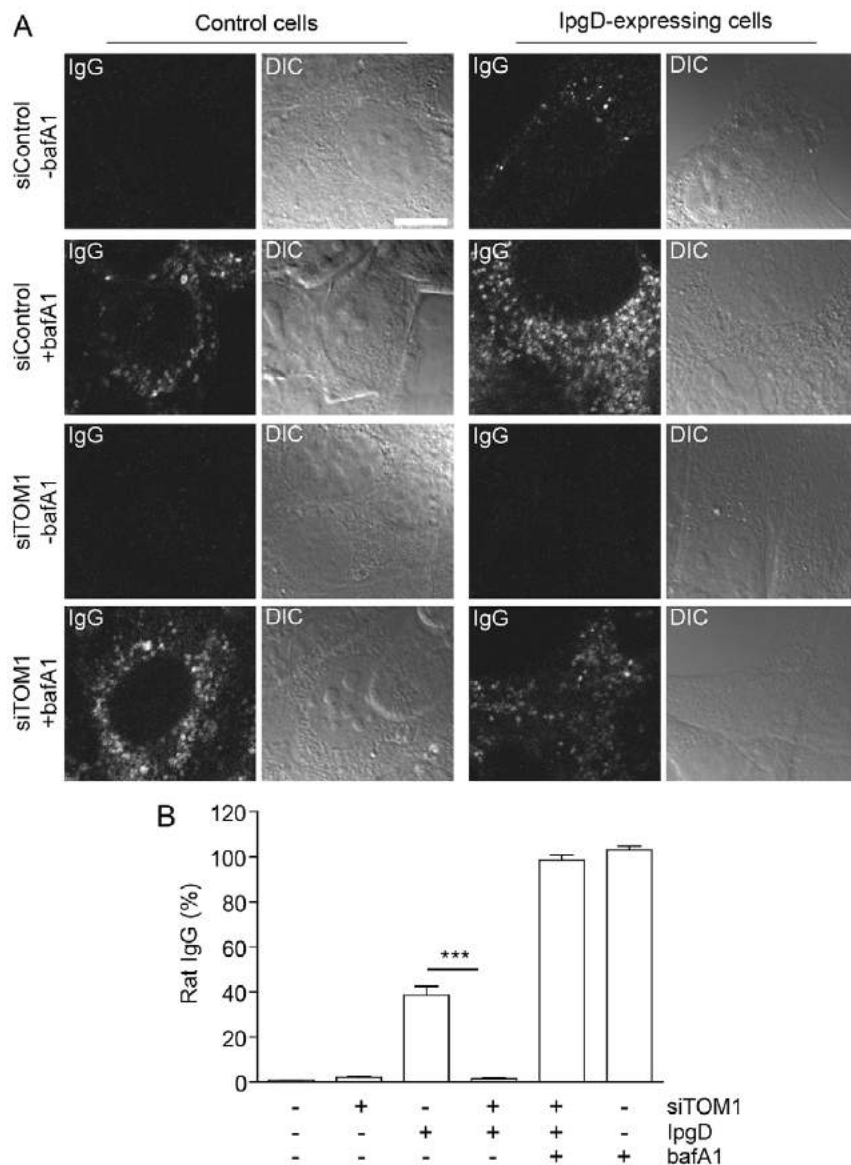


Fig. 5. TOM1 knockdown reverses the inhibition of bulk endocytosis in IpgD-expressing cells.

(A) Control MEF cells or MEFs stably expressing IpgD transfected with control siRNA (siControl) or siRNA targeting TOM1 (siTOM1) were incubated overnight with 40 μ g/ml rat IgG with or without bafilomycin A1 (+/-bafA1, 100 nM). Endocytosed IgG was revealed by immunofluorescence using fluorescent anti-rat antibodies (IgG). Differential interference contrast pictures (DIC) are shown to illustrate the presence of cells. Scale bar: 10 μ m. (B) The number of labeled vesicles per cell was counted for each condition and is expressed as a percentage of control. Results are presented as the mean \pm s.e.m. (three independent experiments). *** P < 0.0001 between the indicated conditions (Student's t -test).

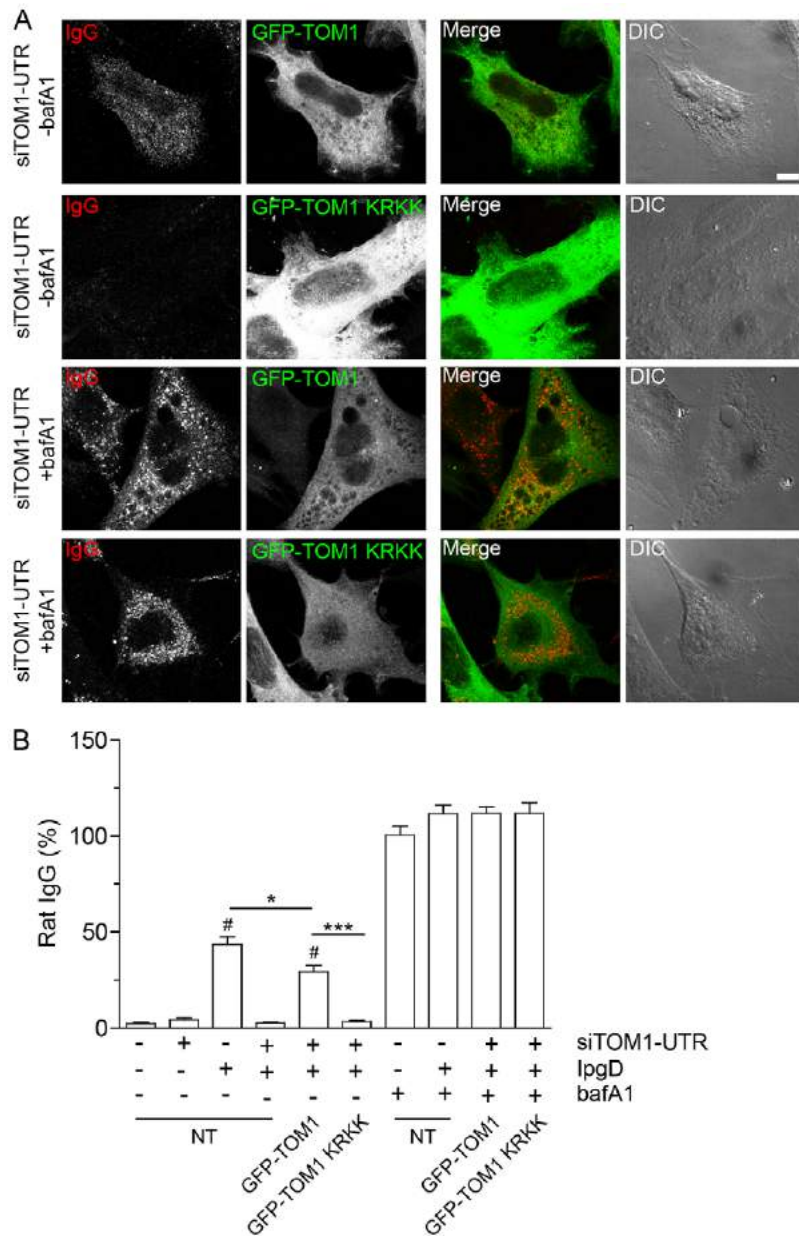


Fig. 6. Binding to PI5P is necessary for TOM1 to block endocytosis. (A) Fluid-phase endocytosis was assessed as in Fig. 5A by assessing rat IgG uptake by IpgD-expressing cells transfected with a siRNA targeting the 3'-UTR region of TOM1 (siTOM1-UTR). DIC, differential interference contrast. Scale bar: 10 μ m. (B) Quantification of rat IgG uptake is expressed as in Fig. 5B. Overexpression of wild-type TOM1 as a GFP fusion protein reverses the phenotype, but this is not observed following overexpression of the KRKK mutant that is unable to bind to PI5P. NT, non-transfected cells. Data show the mean \pm s.e.m. ($n=3$, representing 16–66 cells). # $P<0.001$ versus control; * $P<0.05$ between indicated conditions; *** $P<0.001$ between indicated conditions (Student's t -test).

Taken together, these results show that TOM1 recruitment to signaling endosomes in IpgD-expressing cells is responsible for the endosomal maturation defect and maintenance of survival signals.

DISCUSSION

Taken together, our data provide compelling evidence that, in IpgD-expressing cells, the recruitment of the adaptor protein TOM1 by PI5P is responsible for the blockade of EGFR degradation and fluid-phase endocytosis. The large increase in PI5P levels on endosomes following the expression of the *Shigella flexneri* effector IpgD results in the recruitment of TOM1 to signaling endosomes and perturbs the endolysosomal maturation pathway. This effect is specific to IpgD expression and reflects the ability of the bacteria to subvert cellular processes, such as that shown here involving a trafficking machinery component, for its benefit. PI5P is now recognized as a regulator of different cellular processes but PI5P effectors are

still sparsely described. The first effector ever described for PI5P was ING2, a nuclear protein involved in chromatin regulation (Gozani et al., 2003). ING2 has a PHD domain, also found on many other nuclear proteins that show affinity for PI5P (Keune et al., 2011). However, PI5P effectors outside the nucleus that might be involved in its function on membranes facing the cytosol are sparse. Very recently, our laboratory has shown that PI5P is able to activate the small GTPase Rac1, therefore regulating actin cytoskeleton dynamics and cell invasion (Viaud et al., 2014b). Our present work identifies TOM1, through its VHS domain, as a PI5P effector regulating endosomal maturation.

TOM1 was originally described as a target of the v-myb gene (Burk et al., 1997). Although their cellular functions are still not totally understood, TOM1 and its two orthologs, TOM1L1 and TOM1L2, are proposed to play a role in membrane trafficking (Wang et al., 2010). TOM1L1 shares 31% identity with TOM1 (Seroussi et al., 1999) and has been implicated in src family

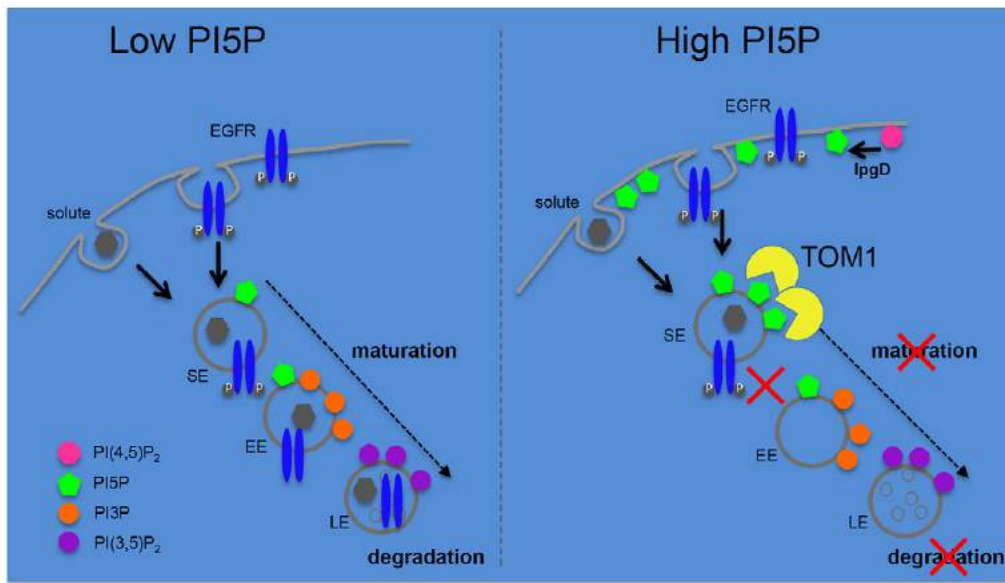


Fig. 7. Model of TOM1 recruitment to signaling endosomes and blockade of endosomal maturation. In control cells with low PI5P levels, stimulated EGFR or soluble cargoes are internalized through the endosomal network and targeted for degradation. When cells are infected by *Shigella flexneri* or express the lipid phosphatase IpgD (high levels of PI5P), TOM1 is recruited to the signaling endosomes (SE) through a direct interaction with its VHS domain and this induces the blockade of both soluble cargoes and activated EGFR, increasing the survival of signals in infected cells. EE, early endosome; LE, late endosome.

kinase mitogenic activity (Li et al., 2005; Collin et al., 2007) and EGFR endocytosis (Liu et al., 2009). The function of TOM1L2, which shares 59% identity with TOM1, is less well defined, although a study with *Tom1l2* gene-trapped mice suggests an important role in the immune response linked to a potential tumor suppressor activity (Girirajan et al., 2008). TOM1 was recently proposed to play a role in autophagy as an adaptor protein targeting myosin VI to signaling endosomes to facilitate autophagosome maturation (Tumbarello et al., 2012). Moreover, TOM1 has been shown to interact with Hrs, an ESCRT-0 component (Brissoni et al., 2006), although this is debated in the literature (Seet et al., 2004). This suggests that TOM1 might serve as an ESCRT component, or at least be associated with the ESCRT machinery, an essential multi-protein complex mediating the degradation of several receptors (Katzmann et al., 2001; Wollert and Hurley, 2010). It has been proposed that TOM1 and Hrs could play parallel roles in clathrin recruitment and sorting of ubiquitylated cargoes on early endosomal membranes, for their subsequent delivery to the lysosomes. Recent phylogenetic analysis shows that TOM1 family proteins form an ancestral ESCRT-0 complex in the amoeboflagellate *Breviate anathema* (Herman et al., 2011), as well as in *Dictyostelium discoideum* (Blanc et al., 2009). The authors demonstrated that in *Dictyostelium*, DdTOM1 interacts with Esp15, a clathrin adaptor protein involved in EGFR internalization (Benmerah et al., 1998) and degradation by the ESCRT complex (Roxrud et al., 2008). However, the data presented here and by others (Tumbarello et al., 2012) clearly demonstrate that, in mammals, TOM1 does not act as an ESCRT protein for EGFR, but might present some specificity towards a specific cargo, as highlighted by its role in the degradation of IL-1 receptor (Brissoni et al., 2006). By contrast, we show that in cells expressing IpgD, PI5P-mediated TOM1 recruitment to endosomes is responsible for the delayed degradation of EGFR, and this is accompanied by an increase in downstream survival signals. In the context of the infection by *Shigella flexneri*, such a subversion of the cellular components represents a massive advantage for the invading bacteria.

The VHS domain of TOM1 was originally described as a protein–protein interaction domain with the potential to bind to

lipid membranes thanks to the presence of a positively charged stretch (Misra et al., 2000). We show here that the mammalian VHS domain of TOM1 can bind directly to PI5P. We propose that in our system, where PI5P levels are increased, the balance between PI3P and PI5P could be modified, which would favor the preferential direct binding of TOM1 to PI5P. We also describe a patch of positively charged residues (K48, R52, K58 and K59) in the TOM1 VHS domain that are important for phosphoinositide binding. We confirm the involvement of these residues in the binding of TOM1 VHS to membranes as proposed by Misra and collaborators (Misra et al., 2000). It has to be noted that the binding was not completely abolished by the mutations, suggesting that other residues in the surroundings might contribute to the binding. For example, R57 has been suggested to be close enough to participate in this contact (Misra et al., 2000; supplementary material Fig. S3). The TOM1 GAT domain could also contribute to the affinity of TOM1 for phosphoinositides. The GAT domain has several ubiquitin-interacting motifs and is involved in the recognition of ubiquitylated protein (Shiba et al., 2004; Akutsu et al., 2005). In TOM1, it differs from the GAT domain of the Golgi-localized, γ -ear, Arf-binding proteins (GGA), a family of adaptors in the TGN. First, it lacks the residues involved in Arf1 binding, which explains its lack of interaction with these small GTPases of the Arf family (Shiba et al., 2004; Wang et al., 2010). Second, the two basic residues involved in GGA1 GAT binding to the phosphoinositide PI4P (R260, R281) are not conserved in TOM1 GAT. In *Dictyostelium*, the GAT domain of DdTOM1 was also shown, like the VHS domain, to bind to phospholipids, mainly to PI(3,5)P₂. However, the residues involved in the lipid binding were not defined (Blanc et al., 2009). Although we show here that human TOM1 GAT domain is able to bind to monophosphorylated phosphoinositides, it does not show any specificity towards PI5P. Our results clearly demonstrate that, in mammalian cells, the TOM1 VHS domain has a dominant role over the GAT domain in phosphoinositide binding and the regulation of cellular trafficking, as demonstrated in our rescue experiments.

It was initially shown that TOM1 is recruited to endosomes through protein–protein interaction with the PI3P-binding

proteins tollip (Kato et al., 2004) and endofin (Seet et al., 2004), endofin being known to be involved in EGFR degradation (Seet and Hong, 2001). It was therefore tempting to postulate that endofin or another binding partner was acting upstream of TOM1 in IpgD-expressing cells to control the degradative pathway. To rule out this possibility, we propose two arguments. First, we excluded the involvement of endofin in the control of EGFR degradation in IpgD-expressing cells. Second, given the fact that the knockdown of TOM1 alone totally abrogates IpgD effects on the degradative pathway, it is very unlikely that an interacting partner plays a role upstream of TOM1. In addition, this demonstrates that neither TOM1L1 nor TOM1L2 have redundant functions with TOM1 in this system.

In a previous study, we showed that PI5P produced by IpgD specifically modulates the degradative pathway and has no effect on the recycling or retrograde pathway (Ramel et al., 2011). Here, we unravel the molecular mechanisms used by PI5P to affect the endolysosomal pathway. We clearly demonstrate that the recruitment of the adaptor TOM1 to signaling endosomes by PI5P is responsible for this perturbation of the endolysosomal pathway, affecting both receptor and soluble cargo degradation and suggesting a role for PI5P and TOM1 at an early step of endocytosis. PI3P has also been shown to control the endolysosomal pathway. However, whether PI3P can affect both transport and sorting is not clear. PI3P was reported to affect receptor sorting, through its interaction with the ESCRT-0 Hrs protein, but not bulk transport (Petiot et al., 2003). However, in podocytes from the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34-invalidated mice, both receptor-mediated endocytosis and fluid-phase uptake are compromised at the level of Rab5 and EEA1-positive early endosomes (Bechtel et al., 2013). It is interesting to note that, in our model, contrary to a loss of PI3P, a strong increase in PI5P leads to the blockade. Moreover, although signaling endosomes were not documented in the Bechtel et al. study, PI5P seems to affect an upstream compartment, i.e. the signaling APPL1 endosomes, the precursors of the Rab5 and EEA1-positive PI3P-rich endosomes (Zoncu et al., 2009). PIKfyve, an enzyme that produces PI5P either by direct phosphorylation of phosphatidylinositol or together with myotubularins from the PI3P and PI(3,5)P₂ pathway (Sbrissa et al., 1999; Tronchère et al., 2004), controls fluid-phase endocytosis but has no effect on receptor tyrosine kinase (RTK) receptors, like the EGFR (Ikonomov et al., 2003). The PIKfyve effect was attributed to PI(3,5)P₂ acting at a later stage of endocytosis. In this study, a potential role for PI5P derived from dephosphorylation of PI(3,5)P₂ was not evoked. In our system, PI5P originates from the plasma membrane pool of PI(4,5)P₂. This difference could explain the blocking of the cargoes at very early stages (i.e. signaling endosomes) of endolysosomal maturation.

Taken together, the results in this study suggest an unprecedented role of PI5P in endosomal maturation and in the regulation of discrete trafficking steps in the endosomal network. We propose a model in which expression of *Shigella flexneri* phosphatase IpgD induces PI5P enrichment in and TOM1 recruitment to signaling endosomes. As a result, the endosomal maturation is blocked, impeding the signaling pathway of RTKs and fluid-phase cargoes (Fig. 7). Therefore, PI5P appears to be a crucial coordinator of multiple fundamental cellular functions, such as the regulation of gene expression, actin cytoskeleton, membrane trafficking and signaling. It is also closely related to the development of several pathologies, such as cancer, diabetes or shigellosis.

MATERIALS AND METHODS

Materials

siRNAs were from Ambion. The negative control used was the Silencer® Select Negative Control No. 1 (#4390843). Two different oligos targeting human TOM1 were used – Silencer® Select Pre-Designed siRNA s19514 and s19515. Initial characterization showed that both siRNAs were able to efficiently silence TOM1 in HeLa cells (human origin), and gave indistinguishable results throughout the study. Owing to the differences in mRNA sequence between the human and mouse TOM1, only s19514 was efficient to deplete TOM1 in MEF cells (mouse origin) and was therefore used in this study on MEF cells. The siRNA targeting the mouse 3'-UTR of TOM1 (referred as siTOM1-UTR) was custom designed and synthesized according to the sequence (sense) 5'-UCCCAUCCUGCUAACGACUAUGAUU-3'. The siRNA s18852 (Ambion) was used to silence endofin (also known as ZFYVE16). The antibodies used in this study were as follows: anti-TOM1 (ab99356, Abcam), anti-TOM1L2 (ab96320, Abcam), anti-Akt (clone H-136, sc-8312, Santa Cruz Biotechnology), anti-pAkt (S473) (clone D9E, #4060, Cell Signaling Technology), anti-EEA1 (#610457, BD Biosciences), anti-actin (A5441, Sigma-Aldrich), anti-GST (clone B-14, sc-138, Santa Cruz Biotechnology), anti-Hsp90 (sc-13119, Santa Cruz Biotechnology), anti-RhoGDI (06-730, Upstate-Millipore), anti-Hrs (clone A-5, #ALX-804-382-C050, Enzo Life Sciences), anti-endofin (#H00009765-D01, Abnova). Antibodies against EGFR were from BD Biosciences (#555996) or from Cell Signaling Technology (clone D38B1, #4267). Control rat IgG was from Abcam (ab37361). Secondary horseradish peroxidase (HRP)-coupled antibodies were from Promega, and Alexa-Fluor-coupled antibodies were from Life Technologies. Other chemicals were from Sigma-Aldrich. The pGFP-C2-TOM1 was kindly provided by Dr Emmanuel Lemichez (INSERM U895, Nice, France) and was as described previously (Visvikis et al., 2011).

qRT-PCR

Total RNA from transfected cells were prepared using the GeneElute Total RNA Mammalian Miniprep kit from Sigma. To prepare cDNA, 1 µg was reverse-transcribed using Superscript III reverse transcriptase (Life Technologies), following the manufacturer's recommendations. Primers were as follows: endofin, 5'-AGGTAGGATGGACAGTTA-3' and 5'-TGAGCAGTGGTTAGAATC-3'; GAPDH, 5'-ACATCGCT-CAGACACCATG-3' and 5'-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3'. The expression of endofin mRNA was normalized against GAPDH mRNA expression.

Molecular cloning and site-directed mutagenesis

Truncated forms of TOM1 were amplified by PCR using pGFP-C2-TOM1 as a template and cloned in frame into the pGEX-KG vector using *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites (underlined in the primer sequences below). The VHS domain was amplified using the following primers: 5'-CGGGATCCATGGACTTTCTCTGGG-3' and 5'-CGGAATTCTCATGGGAACTCCAGGC-3'; the GAT domain was amplified using the following primers: 5'-CGGGATCCACTGACCTGGACATGC-3' and 5'-CGGAATTCTCATTCCGTTTCATGGCGC-3'. Site-directed mutagenesis was performed to introduce the KRKK mutations in the VHS domain of TOM1. All constructs were verified by double-strand sequencing.

Generation of Tet-OFF stable cell lines

MEF cells stably expressing IpgD or Inp54p were generated using standard methods. Briefly, MEF cells validated for the Tet-Off system from Clontech were cultured in G418-containing medium (500 µl/ml), and were transfected with the previously described pTRE2-hyg-2myc vector including the coding sequence for IpgD or Inp54p (Ramel et al., 2011) using Lipofectamine LTX with Plus Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. After 48 h, hygromycin (150 µg/ml) was added to the cells with doxycycline (2 µg/ml) to suppress the transgene expression. Transformants were selected and single-cell-cloned with the limiting dilution method. Expression of IpgD was induced by removal of doxycycline for 24 h.

Cell culture and transfections

BHK and HeLa cells were cultured as described previously (Ramel et al., 2011). cDNA transfection was performed using Effectene (Qiagen). MEF cells were transfected using Lipofectamine LTX with Plus Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. siRNA transfection was performed using Lipofectamine[®] RNAiMAX (Life Technologies) using the reverse transfection protocol, according to the manufacturer's instructions. When needed, the cells were serum-starved for at least 3 h and stimulated as indicated with EGF in serum-free medium for the indicated time.

Endosome purification

Endosome purification was performed as described previously (Gorvel et al., 1991; Ramel et al., 2011). Briefly, BHK cells were serum-starved overnight, gently scraped in ice-cold PBS on ice and homogenized in homogenization buffer (250 mM sucrose, 3 mM imidazole, pH 7.4). The post-nuclear supernatant was adjusted to 40.6% sucrose, loaded at the bottom of a SW41 tube (Beckman Coulter) and layered with 35% and 25% sucrose, 3 mM imidazole pH 7.4 and homogenization buffer. After centrifugation at 35,000 rpm (210,000 *g* at *r*max) for 90 min at 4°C in a SW41 rotor (Beckman Coulter), early endosomes were collected at the interface of the 35–25% sucrose layers and the late endosomes at the interface of the 25% sucrose-homogenization buffer layers. The proper isolation of early endosomes from the late endosomes was verified by western blotting using antibodies specific for each compartment, as described previously (Ramel et al., 2011).

NanoLC-MS/MS analysis

Proteins from the early endosomal fractions were precipitated using methanol-chloroform. Protein samples were then reduced in Laemmli buffer (final composition 25 mM DTT, 2% SDS, 10% glycerol, 40 mM Tris-HCl pH 6.8) for 5 min at 95°C and alkylated with iodoacetamide. Proteins were loaded on a 1D SDS-PAGE gel containing 4–12% acrylamide, made in-house (Mini-Protean, BioRad), and electrophoretic migration was stopped as soon as the protein sample entered the separating gel. The gel was briefly stained with Coomassie Blue and a single band, containing the whole sample, was excised. Proteins were digested overnight with a solution of modified trypsin (20 ng/ μ l, sequence grade, Promega) at 37°C. The resulting peptides were dissolved in 2% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid (TFA). Three independent nano-LC-MS/MS analyses were performed for each sample using an Ultimate 3000 system (Dionex) coupled to an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Each sample was loaded on a C-18 precolumn (300 μ m ID \times 5 mm, Dionex) at 20 μ l/min in 5% acetonitrile, 0.05% TFA. After 5 min of desalting on the precolumn, peptides were separated on a 75 μ m ID \times 15 cm C18 column (packed in-house with Reprosil C18-AQ Pur 3 μ m resin, Dr Maisch; Proxeon Biosystems). Peptides were eluted using a 5–50% linear gradient of solvent B over 110 min [solvent A was 0.2% formic acid in 5% acetonitrile (ACN) and solvent B was 0.2% formic acid in 80% ACN]. The LTQ-Orbitrap Velos was operated in data-dependent acquisition mode with the XCalibur software. Survey scan mass spectra were acquired in the Orbitrap on the 300–2000 *m/z* range with the resolution set to a value of 60,000. The 20 most intense ions per survey scan were selected for collision-induced dissociation (CID) fragmentation and the resulting fragments were analyzed in the linear ion trap (LTQ). Dynamic exclusion was employed within 60 s to prevent repetitive selection of the same peptide.

Database search, data validation and data quantification

The Mascot Daemon software (version 2.2.0, Matrix Science) was used to perform searches in the SwissProt-Trembl database (Uniprot release 2010_09 protein database). Mascot results were parsed with a software developed in-house – Mascot File Parsing and Quantification (MFPaQ, version 4.0.0; Mouton-Barbosa et al., 2010) – and an identified protein was considered as a hit if it was identified with at least two peptides with a score greater than the significance threshold score for a probability $P < 0.05$ or at least one peptide with a score greater than the significance

threshold score for $P < 0.001$, as determined by the Mascot Search program. Quantification of proteins was performed using the label-free module implemented in the MFPaQ v4.0.0 software. In order to perform protein relative quantification, a Protein Abundance Index (PAI) was calculated, defined as the average of XIC (extracts ion chromatograms) area values for the three most intense tryptic peptides identified for this protein. Treated:control ratios were determined by the sum of PAI values in three replicate analyses of the treated condition over the sum of PAI values in three replicate analyses of the control condition. For differential conditions, a Student's *t*-test on the PAI values was used for statistical evaluation of the significance of expression level variations. A twofold change and a *P*-value of 0.05 were used as combined thresholds to define biologically regulated proteins.

Among the 1807 proteins quantified on purified early endosomes, 87 were found to be enriched on early endosomes from IpgD-expressing cells and 43 proteins were lost or greatly reduced. Finally, 1677 proteins were unaltered by IpgD expression. A complete table of the obtained results is available upon request.

Western blotting

Typically, cells were washed in ice-cold PBS and lysed in buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM orthovanadate sodium, 50 mM β -glycerophosphate, protease inhibitor Cocktail Set V (Calbiochem)] for 30 min on ice. Cell lysates were clarified by centrifugation at 10,000 *g* for 10 min at 4°C, and quantified using the BioRad protein assay. Lysates were denatured in Laemmli sample buffer and the proteins were separated by SDS-PAGE, before western blotting on Immobilon-P membranes (Merck-Millipore). Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence with the SuperSignal West Pico detection system (Thermo Scientific) on a ChemiDoc MP acquisition system (BioRad).

Immunofluorescence, rat IgG uptake and quantification

Immunofluorescence was performed essentially as described previously (Boal et al., 2010). Cells grown on glass coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min followed by permeabilization with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min. The cells were then blocked using PBS containing 1% BSA (PBS-BSA) and probed with primary antibodies and secondary antibodies. Coverslips were mounted in Mowiol and imaged by confocal microscopy on either a LSM510 or a LSM780 confocal microscope (Zeiss). For quantification of EGFR signal per cell, the imaging parameters were set to prevent any saturation of the signal. Single cells were selected as regions of interest (ROIs), and the intensity of the EGFR channel reflected the amount of EGFR present in the cell. For quantification of colocalization, Pearson's coefficient was calculated using Volocity software (Perkin Elmer). Briefly, single cells were selected as ROIs, and the Pearson's coefficient was calculated using the autothresholding function.

Rat IgG uptake was performed as described previously (Petiot et al., 2003). Briefly, MEF cells stably expressing IpgD or control MEFs were seeded on glass coverslips, and expression of the transgene was induced by the removal of doxycycline. Nonspecific rat IgG (40 μ g/ml) was incubated overnight in culture medium in the presence or absence of bafilomycin A1 (100 nM). The cells were then fixed and processed for immunofluorescence using a fluorescent anti-rat-IgG antibody. Cells were imaged by confocal microscopy and *z* stacks were acquired throughout the cells. The number of labeled vesicles per cell was counted for each condition and expressed as a percentage of those counted in bafilomycin-A1-treated cells.

Recombinant protein purification, lipid-protein overlay and liposome flotation assays

Recombinant protein purification was essentially as described previously (Boal et al., 2011) using glutathione–Sepharose beads according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). For the lipid-protein overlay assay, PIP Strips[™] or PIP Arrays[™] (Echelon Biosciences) were rehydrated in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBST), blocked in TBST containing 0.2% BSA (fatty-acid free) and incubated overnight with

15 µg/ml GST fusion proteins in TBST. After extensive washes, bound recombinant proteins were detected using an anti-GST antibody followed by an HRP-coupled anti-mouse-IgG antibody. Liposome flotation assays were essentially performed as described previously (Bigay and Antonny, 2005). Briefly, purified recombinant proteins were mixed with extruded liposomes (100 nm, phosphatidylcholine:phosphatidylethanolamine:NBD-phosphatidylethanolamine:PIP 64:28:2:6 mol%).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the unpaired Student's *t*-test. The results are presented as the mean ± s.e.m. and *P*-values considered to be significant are indicated in the figure legends.

Acknowledgements

We would like to thank all the past and present members of the Payrastre laboratory, and Andrea Puhar for helpful discussions relating to this project. We are grateful to Véronique Pons for her initial help with the purification of endosomes.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

F.B. and H.T. conceived and designed the experiments and analyzed the data. F.B., R.M., M.G., M.M., E.S., G.C., J.-M.X. and H.T. performed the experiments. B.P., P.J.S. and O.B.-S. assisted in the development of the project through experimental design and analysis. F.B. and H.T. co-wrote the manuscript.

Funding

This study was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Agence Nationale de la Recherche; Fondation pour la Recherche Médicale; The French Muscular Dystrophy Association (AFM); and by the Centre National de la Recherche Scientifique; the Région Midi-Pyrénées and European funds (FEDER, Fonds Européens de Développement Régional).

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.166314/-DC1>

References

- Akutsu, M., Kawasaki, M., Katoh, Y., Shiba, T., Yamaguchi, Y., Kato, R., Kato, K., Nakayama, K. and Wakatsuki, S. (2005). Structural basis for recognition of ubiquitinated cargo by Tom1-GAT domain. *FEBS Lett.* **579**, 5385–5391.
- Balla, T. (2013). Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol. Rev.* **93**, 1019–1137.
- Bechtel, W., Helmstädter, M., Balica, J., Hartleben, B., Kiefer, B., Hrnjic, F., Schell, C., Kretz, O., Liu, S., Geist, F. et al. (2013). Vps34 deficiency reveals the importance of endocytosis for podocyte homeostasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 727–743.
- Benmerah, A., Lamaze, C., Bègue, B., Schmid, S. L., Dautry-Varsat, A. and Cerf-Bensussan, N. (1998). AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* **140**, 1055–1062.
- Bigay, J. and Antonny, B. (2005). Real-time assays for the assembly-disassembly cycle of COP coats on liposomes of defined size. *Methods Enzymol.* **404**, 95–107.
- Blanc, C., Charette, S. J., Mattei, S., Aubry, L., Smith, E. W., Cosson, P. and Letourneur, F. (2009). Dictyostelium Tom1 participates to an ancestral ESCRT-0 complex. *Traffic* **10**, 161–171.
- Boal, F., Guetzoyan, L., Sessions, R. B., Zeghouf, M., Spooner, R. A., Lord, J. M., Cherfils, J., Clarkson, G. J., Roberts, L. M. and Stephens, D. J. (2010). LG186: An inhibitor of GBF1 function that causes Golgi disassembly in human and canine cells. *Traffic* **11**, 1537–1551.
- Boal, F., Laguerre, M., Milochau, A., Lang, J. and Scotti, P. A. (2011). A charged prominence in the linker domain of the cysteine-string protein Csp α mediates its regulated interaction with the calcium sensor synaptotagmin 9 during exocytosis. *FASEB J.* **25**, 132–143.
- Bonifacino, J. S. (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 23–32.
- Brissoni, B., Agostini, L., Kropf, M., Martinon, F., Swoboda, V., Lippens, S., Everett, H., Aebi, N., Janssens, S., Meylan, E. et al. (2006). Intracellular trafficking of interleukin-1 receptor I requires Tollip. *Curr. Biol.* **16**, 2265–2270.
- Bua, D. J., Martin, G. M., Binda, O. and Gozani, O. (2013). Nuclear phosphatidylinositol-5-phosphate regulates ING2 stability at discrete chromatin targets in response to DNA damage. *Sci. Rep.* **3**, 2137.
- Burk, O., Worpenberg, S., Haenig, B. and Klempner, K. H. (1997). tom-1, a novel v-Myb target gene expressed in AMV- and E26-transformed myelomonocytic cells. *EMBO J.* **16**, 1371–1380.
- Clague, M. J., Urbé, S. and de Lartigue, J. (2009). Phosphoinositides and the endocytic pathway. *Exp. Cell Res.* **315**, 1627–1631.
- Collin, G., Franco, M., Simon, V., Bénistant, C. and Roche, S. (2007). The Tom1L1-clathrin heavy chain complex regulates membrane partitioning of the tyrosine kinase Src required for mitogenic and transforming activities. *Mol. Cell Biol.* **27**, 7631–7640.
- Di Fiore, P. P. and De Camilli, P. (2001). Endocytosis and signaling: an inseparable partnership. *Cell* **106**, 1–4.
- Di Paolo, G. and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657.
- Girirajan, S., Hauck, P. M., Williams, S., Vlangos, C. N., Szomju, B. B., Solaymani-Kohal, S., Mosier, P. D., White, K. L., Jr, McCoy, K. and Elsea, S. H. (2008). Tom12 hypomorphic mice exhibit increased incidence of infections and tumors and abnormal immunologic response. *Mamm. Genome* **19**, 246–262.
- Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M. and Gruenberg, J. (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915–925.
- 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.
- Herman, E. K., Walker, G., van der Giezen, M. and Dacks, J. B. (2011). Multivesicular bodies in the enigmatic amoeboid flagellate *Breviata anathema* and the evolution of ESCRT 0. *J. Cell Sci.* **124**, 613–621.
- Huotari, J. and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J.* **30**, 3481–3500.
- Ikonomov, O. C., Sbrissa, D., Foti, M., Carpentier, J. L. and Shisheva, A. (2003). PIKfyve controls fluid phase endocytosis but not recycling/degradation of endocytosed receptors or sorting of procathepsin D by regulating multivesicular body morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4581–4591.
- Jean, S. and Kiger, A. A. (2012). Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 463–470.
- Jones, D. R., Bultsma, Y., Keune, W. J., Halstead, J. R., Elouarrat, D., Mohammed, S., Heck, A. J., D'Santos, C. S. and Divecha, N. (2006). Nuclear PtdIns5P as a transducer of stress signaling: an in vivo role for PIP4Kbeta. *Mol. Cell* **23**, 685–695.
- Katoh, Y., Shiba, Y., Mitsuhashi, H., Yanagida, Y., Takatsu, H. and Nakayama, K. (2004). Tollip and Tom1 form a complex and recruit ubiquitin-conjugated proteins onto early endosomes. *J. Biol. Chem.* **279**, 24435–24443.
- Katoh, Y., Imakagura, H., Futatsumori, M. and Nakayama, K. (2006). Recruitment of clathrin onto endosomes by the Tom1-Tollip complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 143–149.
- Katzmann, D. J., Babst, M. and Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145–155.
- Keune, W., Bultsma, Y., Sommer, L., Jones, D. and Divecha, N. (2011). Phosphoinositide signalling in the nucleus. *Adv. Enzyme Regul.* **51**, 91–99.
- Leemson, M. A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* **4**, 201–213.
- Li, W., Marshall, C., Mei, L., Dzubow, L., Schmults, C., Dans, M. and Seykora, J. (2005). Srcasm modulates EGF and Src-kinase signaling in keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 6036–6046.
- Liu, N. S., Loo, L. S., Loh, E., Seet, L. F. and Hong, W. (2009). Participation of Tom1L1 in EGF-stimulated endocytosis of EGF receptor. *EMBO J.* **28**, 3485–3499.
- Miaczynska, M., Christoforidis, S., Giner, A., Shevchenko, A., Uttenweiler-Joseph, S., Habermann, B., Wilm, M., Parton, R. G. and Zerial, M. (2004). APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* **116**, 445–456.
- Misra, S., Beach, B. M. and Hurley, J. H. (2000). Structure of the VHS domain of human Tom1 (target of myb 1): insights into interactions with proteins and membranes. *Biochemistry* **39**, 11282–11290.
- Mouton-Barbosa, E., Roux-Dalvai, F., Bouyssie, D., Berger, F., Schmidt, E., Righetti, P. G., Guerrier, L., Boschetti, E., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B. et al. (2010). In-depth exploration of cerebrospinal fluid by combining peptide ligand library treatment and label-free protein quantification. *Mol. Cell Proteomics* **9**, 1006–1021.
- Niebuhr, K., Giuriato, S., Pedron, T., Philpott, D. J., Gaits, F., Sable, J., Sheetz, M. P., Parsot, C., Sansonetti, P. J. and Payrastre, B. (2002). Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the S.flexneri effector IpgD reorganizes host cell morphology. *EMBO J.* **21**, 5069–5078.
- Pendaries, C., Tronchère, H., Arbibe, L., Mounier, J., Gozani, O., Cantley, L., Fry, M. J., Gaits-Iacovoni, F., Sansonetti, P. J. and Payrastre, B. (2006). PtdIns5P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during *Shigella flexneri* infection. *EMBO J.* **25**, 1024–1034.
- Petiot, A., Faure, J., Stenmark, H. and Gruenberg, J. (2003). PI3P signaling regulates receptor sorting but not transport in the endosomal pathway. *J. Cell Biol.* **162**, 971–979.
- Puhar, A., Tronchère, H., Payrastre, B., Nhieu, G. T. and Sansonetti, P. J. (2013). A *Shigella* effector dampens inflammation by regulating epithelial release of danger signal ATP through production of the lipid mediator PtdIns5P. *Immunity* **39**, 1121–1131.

- Ramel, D., Lagarrigue, F., Pons, V., Mounier, J., Dupuis-Coronas, S., Chicanne, G., Sansonetti, P. J., Gaits-Iacovoni, F., Tronchère, H. and Payrastré, B. (2011). Shigella flexneri infection generates the lipid PI5P to alter endocytosis and prevent termination of EGFR signaling. *Sci. Signal.* **4**, ra61.
- Roxrud, I., Raiborg, C., Pedersen, N. M., Stang, E. and Stenmark, H. (2008). An endosomally localized isoform of Eps15 interacts with Hrs to mediate degradation of epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* **180**, 1205–1218.
- Sbrissa, D., Ikononov, O. C. and Shisheva, A. (1999). PIKfyve, a mammalian ortholog of yeast Fab1p lipid kinase, synthesizes 5-phosphoinositides. Effect of insulin. *J. Biol. Chem.* **274**, 21589–21597.
- Seet, L. F. and Hong, W. (2001). Endofin, an endosomal FYVE domain protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 42445–42454.
- Seet, L. F. and Hong, W. (2005). Endofin recruits clathrin to early endosomes via TOM1. *J. Cell Sci.* **118**, 575–587.
- Seet, L. F., Liu, N., Hanson, B. J. and Hong, W. (2004). Endofin recruits TOM1 to endosomes. *J. Biol. Chem.* **279**, 4670–4679.
- Seroussi, E., Kedra, D., Kost-Alimova, M., Sandberg-Nordqvist, A. C., Fransson, I., Jacobs, J. F., Fu, Y., Pan, H. Q., Roe, B. A., Imreh, S. et al. (1999). TOM1 genes map to human chromosome 22q13.1 and mouse chromosome 8C1 and encode proteins similar to the endosomal proteins HGS and STAM. *Genomics* **57**, 380–388.
- Shiba, Y., Katoh, Y., Shiba, T., Yoshino, K., Takatsu, H., Kobayashi, H., Shin, H. W., Wakatsuki, S. and Nakayama, K. (2004). GAT (GGA and Tom1) domain responsible for ubiquitin binding and ubiquitination. *J. Biol. Chem.* **279**, 7105–7111.
- Shisheva, A. (2013). PtdIns5P: news and views of its appearance, disappearance and deeds. *Arch. Biochem. Biophys.* **538**, 171–180.
- Tronchère, H., Laporte, J., Pendaries, C., Chaussade, C., Liaubet, L., Pirola, L., Mandel, J. L. and Payrastré, B. (2004). Production of phosphatidylinositol 5-phosphate by the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 7304–7312.
- Tumbarello, D. A., Waxse, B. J., Arden, S. D., Bright, N. A., Kendrick-Jones, J. and Buss, F. (2012). Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1024–1035.
- Varsano, T., Dong, M. Q., Niesman, I., Gacula, H., Lou, X., Ma, T., Testa, J. R., Yates, J. R., 3rd and Farquhar, M. G. (2006). GIPC is recruited by APPL to peripheral TrkA endosomes and regulates TrkA trafficking and signaling. *Mol. Cell Biol.* **26**, 8942–8952.
- Viaud, J., Boal, F., Tronchère, H., Gaits-Iacovoni, F. and Payrastré, B. (2014a). Phosphatidylinositol 5-phosphate: A nuclear stress lipid and a tuner of membranes and cytoskeleton dynamics. *Bioessays*
- Viaud, J., Lagarrigue, F., Ramel, D., Allart, S., Chicanne, G., Ceccato, L., Courilleau, D., Xuereb, J. M., Pertz, O., Payrastré, B. et al. (2014b). Phosphatidylinositol 5-phosphate regulates invasion through binding and activation of Tiam1. *Nat. Commun.* **5**, 4080.
- Visvikis, O., Boyer, L., Torino, S., Doye, A., Lemonnier, M., Lorès, P., Rolando, M., Flatau, G., Mettouchi, A., Bouvard, D. et al. (2011). Escherichia coli producing CNF1 toxin hijacks Tollip to trigger Rac1-dependent cell invasion. *Traffic* **12**, 579–590.
- von Zastrow, M. and Sorkin, A. (2007). Signaling on the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 436–445.
- Wang, T., Liu, N. S., Seet, L. F. and Hong, W. (2010). The emerging role of VHS domain-containing Tom1, Tom1L1 and Tom1L2 in membrane trafficking. *Traffic* **11**, 1119–1128.
- Wollert, T. and Hurley, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* **464**, 864–869.
- Zoncu, R., Perera, R. M., Balkin, D. M., Pirruccello, M., Toomre, D. and De Camilli, P. (2009). A phosphoinositide switch controls the maturation and signaling properties of APPL endosomes. *Cell* **136**, 1110–1121.

III. Conclusion :

Cette étude nous a permis de montrer grâce à une approche de protéomique différentielle un nouveau partenaire du PtdIns5P, TOM1, impliqué dans la régulation des étapes de maturation des endosomes.

Nous avons comparé le profil protéique d'endosomes purifiés de cellules BHK sur-exprimant ou non IpgD. Nous avons identifié la protéine adaptatrice TOM1 comme un effecteur potentiel du PtdIns5P et montré que cette protéine liait le PtdIns5P par son domaine VHS. La séquestration du PtdIns5P par surexpression de la sonde 3xPHD inhibe le recrutement de TOM1 sur les endosomes. Ainsi, la présence de PtdIns5P dans les endosomes permet le recrutement de la protéine TOM1 via son domaine VHS. Nous avons ensuite montré par diverses approches, notamment de siRNA, que le recrutement de TOM1 par le PtdIns5P est essentiel au blocage de maturation des endosomes vers les lysosomes et contrôle le retard de dégradation de l'EGFR dans ce modèle. Le recrutement de TOM1 par le PtdIns5P sur les endosomes est donc déterminant pour maintenir les signaux pro-survie émis par l'EGFR dans la cellule hôte au profit du pathogène.

Discussion et perspectives

Discussion :

I. Détection et rôle de la myotubularine MTM1 dans les plaquettes

Depuis sa découverte en 1997 par Rameh *et al.* (Rameh et al., 1997b), le PtdIns5P, un second messenger lipidique, a fait l'objet de plusieurs études qui ont permis de préciser certaines de ses fonctions, sa localisation ainsi que les enzymes impliquées dans sa production (Viaud et al., 2014a). Il existe plusieurs pools de PtdIns5P localisés sur des compartiments différents, ce qui lui confère des fonctions différentes dans la cellule. Par exemple, dans le noyau il est impliqué dans la modulation de l'expression des gènes (Bua et al., 2013; Bunce et al., 2008; Gozani et al., 2003; Jones et al., 2006). Notre équipe et plusieurs autres ont montré qu'il possède aussi un rôle dans la régulation de la survie cellulaire, du trafic vésiculaire et de la régulation du cytosquelette d'actine lié à sa localisation dans la membrane plasmique et les compartiments intracellulaires (Boal et al., 2015, 2016; Haugsten et al., 2013; Oppelt et al., 2013; Ramel et al., 2011; Viaud et al., 2014b). La production du PtdIns5P implique différentes kinases et phosphatases tels que les myotubularines, PIKfyve et la 4-phosphatase de type I. Lors de mes travaux de thèse, je me suis focalisée sur le rôle de deux enzymes impliquées dans le métabolisme du PtdIns5P, la 3-phosphatase myotubularine MTM1 et la 5-kinase PIKfyve, dans la maintenance des granules des mégacaryocytes et des plaquettes.

Ainsi, dans la première partie de mon étude, j'ai pu observer que dans les plaquettes, MTM1, par son activité 3-phosphatase, était capable d'hydrolyser le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P₂ *in vitro*. J'ai pu montrer la présence de MTM1 sur les granules denses, ce qui suggère que ses substrats (PtdIns3P et PtdIns(3,5)P₂) et produits (PtdIns et PtdIns5P) pourraient jouer un rôle dans la maintenance et l'exocytose de ces granules. De plus, il a été montré que le taux de PtdIns5P augmente après activation plaquettaire à la thrombine (Morris et al., 2000). Cependant, nos résultats ont montré que les souris MTM1 knockout ne présentent pas de défauts plaquettaires. En effet, ces souris ne sont pas thrombocytopéniques et l'agrégation et la sécrétion plaquettaire suite à une induction par la thrombine ou le collagène n'est pas significativement différente des plaquettes contrôles. Ces résultats sont cohérents avec le fait que les patients XLCNM, qui portent des mutations dans le gène MTM1, ne présentent pas de diathèse hémorragique. Par conséquent, MTM1 est une enzyme qui ne semble pas essentielle

pour la production des plaquettes et leur activation. La présence de plusieurs membres actifs de la famille des myotubularines dans les mégacaryocytes suggère un rôle redondant de ces enzymes. En effet, j'ai pu observer la présence de MTMR2 dans les plaquettes et l'augmentation du taux de mRNA de plusieurs myotubularines au cours de la différenciation *in vitro* dans les progéniteurs mégacaryocytaires humains ainsi que dans la lignée mégacaryoblastique humaine MEG-01.

Cette étude a surtout permis de proposer un diagnostic rapide pour la myopathie centronucléaire XLCNM. Son diagnostic repose actuellement sur l'analyse histologique de biopsie musculaire, avec notamment l'observation d'un noyau centralisé, et sur des tests génétiques. Cependant, ces approches invasives peuvent prendre plusieurs jours, voire des semaines, pour aboutir à un diagnostic concluant. Ainsi, un test rapide, utilisable chez les nouveaux nés, pour évaluer l'expression de MTM1 serait utile pour aider au diagnostic de cette maladie. En effet, dans la majorité des cas, notamment les plus graves, l'expression de MTM1 est perdue. Nos résultats montrent que 100µl de sang sont suffisants pour détecter MTM1 dans le culot cellulaire du plasma riche en plaquettes et leucocytes par immunoblot. Actuellement, il existe peu d'anticorps dirigés contre MTM1 et ceux que nous avons pu tester ne nous ont pas permis de détecter cette protéine par cytométrie en flux, qui serait une technique rapide, nécessitant très peu de sang et facile à utiliser en laboratoires hospitaliers. Le développement de nouveaux anticorps pourra permettre d'envisager la détection de MTM1 également par ELISA, une technique facile à mettre en œuvre dans les services hospitaliers. Nos résultats suggèrent aussi que la plaquette pourrait être utilisée pour le diagnostic de plusieurs pathologies génétiques, non seulement de la myopathie centronucléaire XLCNM, mais également de la neuropathie de Chacot-Marie-Tooth liée à la perte d'expression de MTMR2. Ce travail sera poursuivi en collaboration avec l'équipe de J. Laporte à Strasbourg. Nous validerons le test à partir de prélèvements sanguins de patients et interagissons avec des industriels, dont certains sont intéressés par le développement d'une trousse diagnostic.

II. Rôle du PtdIns5P dans la biogenèse et le maintien des granules plaquettaires

Dans la deuxième partie de mon travail, j'ai étudié le rôle du PtdIns5P dans le maintien de l'intégrité et de la mobilité des granules plaquettaires dans les MK. Les principales données de cette étude ont été obtenues sur une lignée cellulaire mégacaryoblastique humaine MEG-01, établie en 1983, à partir de la moelle osseuse d'un patient atteint d'une leucémie myéloïde chronique (Ogura et al., 1985). Ces cellules sont porteuses du chromosome de Philadelphie conduisant à l'expression de la protéine de fusion oncogénique Bcr-Abl. Différentes études ont été faites sur cette lignée qui a été utilisée également comme modèle de formation de plaquettes *in vitro* (Imamura et al., 1990a, 1990b; Takeuchi et al., 1991, 1998). La différenciation des MEG-01 est faite par l'acide valproïque, un inhibiteur d'histone déacétylases, utilisé comme médicament pour traiter l'épilepsie et les troubles bipolaires. Une étude a montré que l'acide valproïque est aussi efficace que le PMA (Phorbol myristate acetate) ou l'ATRA (all-trans retinoic acid) pour obtenir des MEG-01 différenciées possédant les caractéristiques de MK. L'acide valproïque est capable de pousser les cellules MEG-01 à produire des plaquettes *in vitro* (Schweinfurth et al., 2010). Cependant, ce modèle cellulaire transformé a des limites et il était important de reproduire les résultats sur des MK primaires de souris. La difficulté de travailler sur ces cellules primaires qui sont fragiles, assez difficiles à obtenir et surtout à synchroniser dans leur différenciation, n'a cependant pas permis de réaliser toute les expériences que nous aurions souhaitées sur ce modèle.

J'ai commencé cette étude par la localisation du PtdIns5P dans les MEG-01. Dans d'autres modèles cellulaires comme les cellules HeLa, les BHK et les MEF, le PtdIns5P a été retrouvé sur les endosomes précoces (Boal et al., 2015; Ramel et al., 2011; Viaud et al., 2014b). Cependant, dans les MEG-01 nous avons localisé ce lipide dans des compartiments endosomaux tardifs. Le PtdIns5P se trouve aussi sur les granules denses et dans une moindre mesure les granules alpha des MEG-01, ce qui nous a poussés à émettre l'hypothèse que ce lipide pourrait potentiellement avoir un rôle dans le contrôle de l'intégrité des granules plaquettaires. Les PI sont des messagers lipidiques impliqués dans différentes fonctions cellulaires, notamment dans le transport des protéines entre les différents compartiments vésiculaires. En recrutant et/ou activant des protéines effectrices, ils sont impliqués dans la

régulation du bourgeonnement vésiculaire, la fusion ou la dynamique des membranes et du cytosquelette. Il nous a donc paru important de rechercher comment est produit le PtdIns5P dans les cellules MEG-01 et s'il pouvait être impliqué dans l'intégrité des granules ainsi que dans le tri de leurs cargos spécifiques. Mes travaux montrent que PIKfyve est l'enzyme principalement responsable de la production de PtdIns5P dans les cellules. J'ai donc choisi une approche d'inhibition pharmacologique de PIKfyve afin de mettre en évidence le rôle du PtdIns5P dans le maintien de l'identité des granules plaquettaires. Il existe actuellement plusieurs inhibiteurs de PIKfyve. Au début de mon étude j'ai utilisé le YM201636 (Jefferies et al., 2008) mais un second inhibiteur, le STA5326 (ou apilimod) (Cai et al., 2013) a été ensuite montré comme étant plus puissant et sélectif de PIKfyve (IC_{50} de 14 nM contre 33 nM pour le YM201636), ce qui m'a conduit à l'utiliser pour poursuivre mon étude.

L'inhibition de PIKfyve par le STA5326 entraîne une diminution de 75% du taux de PtdIns5P dans les MEG-01. De plus, on observe après traitement au STA5326, l'apparition de vacuoles élargies dans les MEG-01 et les MK de souris. Ces vacuoles sont typiques de l'inhibition de PIKfyve et ont été décrites dans plusieurs études (Cai et al., 2013; Ikononov et al., 2001; Jefferies et al., 2008; de Lartigue et al., 2009). Il faut noter que la dose de STA5326 nécessaire pour obtenir ce phénotype dans les MK de souris est 5 fois plus forte que celle utilisée sur les MEG-01. Ceci pourrait être dû au réseau membranaire très dense des MK et/ou à un système d'export des drogues plus performant.

En plus du PtdIns5P, PIKfyve est également responsable de la formation de PtdIns(3,5)P₂. Jusqu'à présent très peu d'études ont évoqué l'implication du PtdIns5P dans l'apparition des vacuoles et ont surtout considéré le rôle du PtdIns(3,5)P₂. Ceci résulte principalement d'études réalisées dans les années 1990 chez la levure montrant que: i) l'expression de PIKfyve dans des levures délétées pour Fab1 (l'orthologue de PIKfyve) restaure le taux de PtdIns(3,5)P₂ mais pas de PtdIns5P (McEwen et al., 1999) et ii) l'absence de détection du PtdIns5P d'une façon constitutive chez les levures (Gary et al., 1998). De plus, une étude un peu plus récente, a montré que dans des cellules COS-7 surexprimant un dominant négatif de PIKfyve et présentant des vésicules élargies, seul le PtdIns(3,5)P₂ était capable de restaurer un phénotype normal (Ikononov et al., 2002b).

Mes travaux montrent que les vésicules élargies, formées après inhibition de PIKfyve, contiennent les marqueurs des granules denses et des granules alpha, que ce soit dans les MEG-01, les MK de souris ou les plaquettes humaines. Ces résultats montrent pour la première fois que l'inhibition de PIKfyve conduit à la perte d'identité des granules et nous amènent à proposer l'hypothèse d'une fusion (ou une inhibition de la fission) entre les endosomes et les granules. Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse selon laquelle le PtdIns5P inhibe la fusion des granules. En effet, ce lipide pourrait modifier la composition lipidique des membranes et affecter leur fluidité et ainsi faciliter les mécanismes de fusion. Cette augmentation du PtdIns5P au niveau des granules pourrait également être à l'origine du recrutement de partenaires protéiques du PtdIns5P, comme TOM1 que nous avons mis en évidence lors de l'expression de l'effecteur bactérien IpgD (voir article 3). Ces partenaires protéiques du PtdIns5P seraient responsables de l'altération des mécanismes de fissions et fusions. De plus, le traitement au STA5326 entraîne une perte totale de la mobilité des granules alpha et denses, montrant l'implication de PIKfyve également dans la mobilité des granules.

La formation des vésicules élargies, contenant les marqueurs des granules denses et des granules alpha, a été confirmée par invalidation de PIKfyve par siRNA. De façon intéressante, l'addition de PtdIns5P sur des MEG-01 traitées au STA5326 induit de nouveau la ségrégation des granules denses et des granules alpha. Ceci démontre le rôle du PtdIns5P dans le maintien de l'intégrité et de l'identité des granules. De même, la mobilité des granules a été restaurée. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu par le PtdIns5P dans le contrôle de l'identité des granules restent encore à définir. De plus, il est difficile d'affirmer que le PtdIns5P soit directement ou le seul actif dans ce processus. En effet, une partie de ce lipide rajouté de façon exogène pourrait avoir été transformé en PtdIns(3,5)P₂ comme mes données pourraient le suggérer.

L'ensemble de ces résultats montre pour la première fois que PIKfyve et le PtdIns5P sont des acteurs majeurs dans la dynamique et l'intégrité des granules. Ces résultats montrent également que les granules ne sont pas des entités figées mais que la maintenance de leur identité est un phénomène actif sous contrôle des PI.

III. Rôle de PIKfyve dans les plaquettes

Pour aller plus loin dans cette étude, j'ai étudié l'effet de l'inhibition de PIKfyve sur les granules dans les plaquettes humaines. Mes résultats montrent que PIKfyve est impliquée dans le maintien de l'intégrité des granules et des fonctions plaquettaires. En effet, l'inhibition de PIKfyve par le STA5326 rajouté à du sang total provoque une diminution de la surface occupée par les thrombi formés sur une matrice de collagène dans des conditions de flux sanguin artériel. Le volume de ces thrombi est également nettement diminué. De plus, la sécrétion d'ATP, après stimulation avec 0.5µg/ml de CRP (collagen related peptide) est aussi diminuée suite à l'inhibition de PIKfyve dans le sang total. Ces résultats suggèrent un rôle du PtdIns5P et/ou du PtdIns(3,5)P₂, non seulement dans l'intégrité et la mobilité des granules dans les MK, mais aussi dans leur identité et leur biologie dans les plaquettes.

Il est important de noter que nos résultats diffèrent des résultats obtenus chez des souris knockout PIKfyve dans les MK et les plaquettes (Min et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs montrent que la perte de PIKfyve dans la lignée mégacaryocytaire n'affecte pas la maturation des MK dans la moelle osseuse et que ces souris ont un compte plaquettaire normal. Les plaquettes des souris PIKfyve KO ne présentent pas de défaut d'agrégation ou de sécrétion des granules. Cependant, ces souris KO présentent une réponse thrombotique augmentée liée à un défaut de maturation des lysosomes et une sécrétion accrue des protéines lysosomales. Il est à noter que, de façon surprenante, ce modèle de KO entraîne des défauts dans de multiples organes (retard de croissance, réduction de la masse graisseuse, réduction de la densité osseuse, infertilité) et une augmentation de la réponse inflammatoire. Ce dernier point est également en opposition avec les résultats obtenus par l'inhibition pharmacologique de PIKfyve par le STA5326 ou l'APY0201 qui entraîne une réduction de la réponse inflammatoire (Cai et al., 2013, 2014; Hayakawa et al., 2014). Le phénotype des souris invalidées pour PIKfyve dans les MK et les plaquettes est très surprenant et inattendu. Il met à jour un rôle insoupçonné et potentiellement très intéressant des MK/plaquettes et de leur système de lysosomes dans l'homéostasie corporelle chez la souris et pose de nombreuses questions. Il pourrait cependant être le résultat d'une fuite de la PF4-Cre recombinase dans d'autres cellules telles que les macrophages (Pertuy et al., 2015) ou de la mise en place de mécanismes de compensation entraînant des dérégulations multiples. On sait aujourd'hui que,

malgré leur grand intérêt, les approches de KO font parfois apparaître des mécanismes compensatoires et/ou la perte de l'expression de partenaires de la protéine cible.

Il est important de noter que ce modèle des souris invalidées pour PIKfyve dans les MK et les plaquettes permet d'étudier les mécanismes de genèse des organites plaquettaires lors de la mégacaryopoïèse, ce qui est très différent de notre approche pharmacologique puisque dans nos expériences l'inhibition de PIKfyve s'opère alors que les granules sont formés dans des MK différenciés. Notre approche s'intéresse donc à la maintenance des granules et non à leur biogenèse.

Ainsi, des études complémentaires seront nécessaires afin de préciser le rôle de PIKfyve dans les MK et dans les fonctions plaquettaires.

Perspectives :

Le rôle des PI dans les MK reste un sujet encore peu abordé dans la littérature, il sera donc important de poursuivre cette étude et de l'étendre à d'autres phosphoinositides et phosphoinositides kinases et phosphatases. Mon projet s'est focalisé sur le rôle de PIKfyve et du PtdIns5P, un lipide encore assez mal connu, et nos résultats ouvrent plusieurs axes de travail. Il serait par exemple intéressant d'étudier le rôle des différentes enzymes impliquées dans le métabolisme du PtdIns5P dans les MK et les plaquettes, et d'identifier les protéines qui interagissent avec ce lipide et avec PIKfyve pour mieux comprendre leur mécanisme d'action. De plus, pour analyser le rôle de PIKfyve dans la genèse des granules plaquettaires et des lysosomes, et mieux comprendre le phénotype décrit dans le modèle de souris KO dans les mégacaryocytes, nous avons débuté la génération de nos propres souris déficientes en PIKfyve dans les MK en collaboration avec le Pr. Shisheva. Enfin, pour aller plus loin que le modèle du MK, il serait intéressant d'étudier de façon approfondie le rôle de PIKfyve et du PtdIns5P dans la plaquette.

I. Rôle des enzymes du métabolisme du PtdIns5P et du PtdIns(3,5)P₂

Il serait intéressant d'étudier l'expression des différentes kinases et phosphatases susceptibles d'être impliquées directement ou indirectement dans le métabolisme du PtdIns5P et du PtdIns(3,5)P₂ durant la maturation du MK en utilisant le modèle cellulaires MEG-01 ainsi que les MK de souris ou humains différenciés à partir de cellules souche CD34⁺. Cette étude pourra être réalisée en étudiant le niveau d'ARNm par RT-qPCR et la quantité de protéines par immunoblotting avec les anticorps disponibles sur le marché. Pour étudier leur rôle dans la maintenance de l'homéostasie des granules, nous prévoyons d'utiliser un criblage shRNA, utilisant le système de vecteur lentiviraux, afin d'invalider les différentes enzymes impliquées directement ou indirectement dans la production de ces lipides, notamment les myotubularines qui déphosphorylent le PtdIns(3,5)P₂ en PtdIns5P, les 4-phosphatases de type II qui transforment le PtdIns(4,5)P₂ en PtdIns5P, et la PI3K de classe III Vps34 qui produit le PtdIns3P, substrat de PIKfyve. Nous nous intéresserons également aux protéines du complexe PAS, Fig4/Sac3 et Vac14/ArPIKfyve dont l'expression sera inhibée par shRNA ou siRNA. Dans ce contexte, nous pourrions doser le taux du PtdIns5P et, par HPLC après radiomarquage

des cellules, le PtdIns(3,5)P₂ qui, contrairement au PtdIns5P, ne peut être dosé par un test de quantification en masse. Nous pourrions également utiliser un modèle de souris knockout de Vps34 spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire sous le contrôle du promoteur PF4, que nous venons de générer dans l'équipe. Les MK de ces souris présentent des défauts de granules alpha et un taux de PtdIns3P nettement diminué, suggérant une diminution potentielle du taux du PtdIns(3,5)P₂ et de PtdIns5P, si ce dernier provient de l'hydrolyse du PtdIns(3,5)P₂. Ces expériences pourraient permettre de préciser la voie de biosynthèse du PtdIns5P dans le MK.

Nous pourrions également chercher à identifier les potentiels partenaires du PtdIns5P et du PtdIns(3,5)P₂ dans les MK et les plaquettes. Des lysats de plaquettes ou de MK pourront être incubés avec des billes recouvertes de PtdIns5P ou de PtdIns(3,5)P₂ et les protéines associées seront ensuite analysées par protéomique par la technique dite de shotgun, sur un LTQ-Orbitrap (plateforme de protéomique de l'IPBS, Toulouse). Cette analyse pourra donner des idées plus précises sur les mécanismes de signalisation de ces lipides.

II. Rôle de PIKfyve dans la mégacaryopoïèse et dans les plaquettes

Deux approches *in vivo* pourront être envisagées afin d'étudier le rôle de PIKfyve et de ses produits dans la mégacaryopoïèse. La première consiste en la génération de souris transgéniques Cre-Lox pour PIKfyve, spécifique pour la lignée mégacaryocytaire sous le contrôle du promoteur PF4. Les souris LoxP PIKfyve ont été obtenues par collaboration avec le Pr. Shisheva (Wayne State University School of Medicine, Detroit). Ces souris présentent une délétion dans l'exon 6 de PIKfyve, ce qui a pour conséquence d'introduire un décalage du code de lecture et l'apparition d'un codon stop au résidu 171, avant le premier domaine conservé de PIKfyve. Nous aurons donc en notre possession un modèle de souris knockout pour PIKfyve différent de celui généré par Min et al. (Min et al., 2014) pour lequel la délétion affecte les exon 37-38 dans le domaine kinase.

Une autre approche envisagée est de suivre la mégacaryopoïèse chez des souris traitées au STA5326 d'une façon aiguë et/ou chronique. Le traitement aigu consistera à injecter les souris en intrapéritonéal ou intraveineuse avec le STA5326, à une dose de 5mg/kg pendant 1 à 3 jours de façon à toucher principalement les plaquettes circulantes. Le traitement

chronique, allant jusqu'à deux semaines, permettra d'étudier le rôle de PIKfyve dans les processus de genèse des plaquettes à partir des MK (compte plaquettaire, nombre et morphologie des granules alpha et denses et des lysosomes). Nous pourrions aussi étudier la sécrétion et l'agrégation plaquettaire *ex-vivo*, ainsi que les processus de thrombose *in vivo* suite à une lésion de la carotide au FeCl₃. Des résultats préliminaires (Figure 23) obtenus chez des souris C57B6 ayant subi des injections de STA5326 par voie intrapéritonéale (3 fois par jour, dose de 5mg/kg pendant 3 jours) montrent une augmentation du temps de formation d'un thrombus occlusif de la carotide suite à une lésion par le FeCl₃ chez la moitié des animaux. Cependant, le nombre trop faible d'animaux analysés ne permet pas de tirer des conclusions et une série d'expériences comprenant plus de souris est envisagé. L'obtention prochaine de la lignée PIKfyve KO permettra de compléter cette étude par des expériences de thrombose *in vivo* (lésion carotidienne par le FeCl₃, lésion artérielle par laser et microscopie intravitale en collaboration avec l'équipe du Dr C. Gachet à Strasbourg).

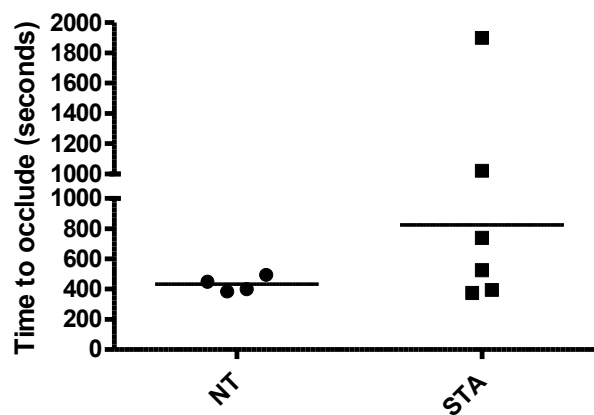


Figure 23 : Temps d'occlusion de la carotide suite à une lésion par le FeCl₃. Les carotides droite et gauche des souris ont été disséquées du tissu qui les entoure et un bout de papier de 1x4 mm saturé par une solution de FeCl₃ à 7.5% a été appliqué sur la carotide droite pendant 3 minutes. La carotide gauche est utilisée comme le contrôle interne. Les sondes utilisées pour mesurer le flux sanguin, ont été connectées à un système d'enregistrement (Transonic System; Emka Technologies). Le temps d'occlusion total (arrêt du flux sanguin par formation d'un thrombus occlusif) est enregistré. NT: souris contrôles, non traitées, STA: souris traitées au STA5326 par voie intrapéritonéale 3 fois par jour pendant 3 jours à une dose de 5mg/kg.

III. Rôle du PtdIns5P et de PIKfyve dans le déplacement des granules

Lors de la différenciation du MK, on assiste à une distribution très contrôlée du nombre de chacun des types de granules pour chaque proplaquette. Cet aspect de la maturation des MK n'est pas très bien connu mais il est décrit que les organelles voyagent le long des microtubules jusqu'au extrémités des proplaquettes grâce à l'intervention de protéines moteurs comme la dynéine et la dynactine (Patel et al., 2005b; Richardson et al., 2005). De même, il a été démontré que les granules utilisent l'actomyosine pour se déplacer vers les proplaquettes (Pertuy et al., 2014).

Le PtdIns(4,5)P₂ est connu pour réguler la localisation de nombreuses protéines du cytosquelette d'actine mais d'autres PI pourraient être impliqués. Il serait intéressant de déterminer le rôle du PtdIns3P, PtdIns5P et PtdIns(3,5)P₂ dans la régulation des interactions organelles/microtubules et organelles/F-actine. Mes résultats montrent un arrêt de mobilité des granules suite à une inhibition de PIKfyve par le STA5326. De façon remarquable l'addition de PtdIns5P perméant est capable de restaurer la dynamique de ces granules, montrant l'implication du PtdIns5P dans la mobilité de ces granules. Plusieurs protéines candidates pourraient faire le lien entre ce PI présent sur la membrane des organelles et les protéines motrices. C'est le cas des SNX (Sorting Nexins) qui interagissent avec une protéine liant la dynéine (Traer et al., 2007). Les SNX n'ont pas été étudiées dans le MK mais cette famille de protéine joue un rôle important dans le tri au niveau des endosomes dans d'autres modèles cellulaires par sa capacité à lier les PI par leurs domaines PX et à initier la courbure des membranes par leurs domaines BAR. De plus, PIKfyve interagit avec l'adaptateur JLP, connu pour réguler la liaison de la kinésine aux organelles (Ikonov et al., 2009b). La localisation des différents acteurs pourra être étudié après manipulation des myotubularines et d'autres enzymes impliquées dans la voie du PtdIns5P et du PtdIns(3,5)P₂ par technique d'interférence ARN (crible évoqué précédemment), les inhibiteurs spécifiques à notre disposition et les modèles de souris KO pour Vps34 et PIKfyve décrits précédemment.

En conclusion, les perspectives ouvertes par ces travaux de thèse, dans un domaine encore peu exploré, devraient permettre de mieux comprendre les voies d'implication des lipides

PtdIns5P et PtdIns(3,5)P₂ dans la genèse, la mobilité et la maintenance de l'homéostasie des granules plaquettaires ainsi que dans le tri des protéines cargo vers ces granules.

Bibliographie

A

Albers, C.A., Cvejic, A., Favier, R., Bouwmans, E.E., Alessi, M.-C., Bertone, P., Jordan, G., Kettleborough, R.N.W., Kiddle, G., Kostadima, M., et al. (2011). Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome. *Nat. Genet.* *43*, 735–737.

Al Hawas, R., Ren, Q., Ye, S., Karim, Z.A., Filipovich, A.H., and Whiteheart, S.W. (2012). Munc18b/STXBP2 is required for platelet secretion. *Blood* *120*, 2493–2500.

Ali, S., Ghosh, K., and Shetty, S. (2015). Differential expression of genes involved in Bengal macrothrombocytopenia (BMTCP). *Blood Cells. Mol. Dis.* *55*, 410–414.

Ambrosio, A.L., Boyle, J.A., and Di Pietro, S.M. (2012). Mechanism of platelet dense granule biogenesis: study of cargo transport and function of Rab32 and Rab38 in a model system. *Blood* *120*, 4072–4081.

Ambrosio, A.L., Boyle, J.A., and Di Pietro, S.M. (2015). TPC2 mediates new mechanisms of platelet dense granule membrane dynamics through regulation of Ca²⁺ release. *Mol. Biol. Cell* *26*, 3263–3274.

Amoasii, L., Bertazzi, D.L., Tronchère, H., Hnia, K., Chicanne, G., Rinaldi, B., Cowling, B.S., Ferry, A., Klaholz, B., Payrastra, B., et al. (2012). Phosphatase-dead myotubularin ameliorates X-linked centronuclear myopathy phenotypes in mice. *PLoS Genet.* *8*, e1002965.

An, E., Ogata, K., Kuriya, S., and Nomura, T. (1994). Interleukin-6 and erythropoietin act as direct potentiators and inducers of in vitro cytoplasmic process formation on purified mouse megakaryocytes. *Exp. Hematol.* *22*, 149–156.

Antkowiak, A., Viaud, J., Severin, S., Zanoun, M., Ceccato, L., Chicanne, G., Strassel, C., Eckly, A., Leon, C., Gachet, C., et al. (2016). Cdc42-dependent F-actin dynamics drive structuration of the demarcation membrane system in megakaryocytes. *J. Thromb. Haemost. JTH.*

Apitz-Castro, R., Cruz, M.R., Ledezma, E., Merino, F., Ramirez-Duque, P., Dangelmeier, C., and Holmsen, H. (1985). The storage pool deficiency in platelets from humans with the Chédiak-Higashi syndrome: study of six patients. *Br. J. Haematol.* *59*, 471–483.

Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., et al. (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat. Med.* *10*, 64–71.

B

Bacon, C.M., Tortolani, P.J., Shimosaka, A., Rees, R.C., Longo, D.L., and O’Shea, J.J. (1995). Thrombopoietin (TPO) induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT5 and STAT3. *FEBS Lett.* *370*, 63–68.

Badimon, L., and Vilahur, G. (2014). Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J. Intern. Med.* *276*, 618–632.

Balla, T. (2013). Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol. Rev.* *93*, 1019–1137.

Barbosa, M.D., Nguyen, Q.A., Tchernev, V.T., Ashley, J.A., Detter, J.C., Blydes, S.M., Brandt, S.J., Chotai, D., Hodgman, C., Solari, R.C., et al. (1996). Identification of the homologous beige and Chédiak-Higashi syndrome genes. *Nature* *382*, 262–265.

- Barbosa, M.D., Barrat, F.J., Tchernev, V.T., Nguyen, Q.A., Mishra, V.S., Colman, S.D., Pastural, E., Dufourcq-Lagelouse, R., Fischer, A., Holcombe, R.F., et al.** (1997). Identification of mutations in two major mRNA isoforms of the Chediak-Higashi syndrome gene in human and mouse. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 1091–1098.
- Baron, M.H.** (2003). Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. *Exp. Hematol.* *31*, 1160–1169.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M.** (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* *16*, 585–601.
- Bartley, T.D., Bogenberger, J., Hunt, P., Li, Y.S., Lu, H.S., Martin, F., Chang, M.S., Samal, B., Nichol, J.L., and Swift, S.** (1994). Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* *77*, 1117–1124.
- Battinelli, E.M., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E.** (2007). Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* *14*, 419–426.
- Becker, R.P., and De Bruyn, P.P.** (1976). The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am. J. Anat.* *145*, 183–205.
- Beggs, A.H., Böhm, 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 14697–14702.
- Behnke, O.** (1968). An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J. Ultrastruct. Res.* *24*, 412–433.
- Behnke, O.** (1969). An electron microscope study of the rat megakaryocyte. II. Some aspects of platelet release and microtubules. *J. Ultrastruct. Res.* *26*, 111–129.
- Behnke, O.** (1992). Degrading and non-degrading pathways in fluid-phase (non-adsorptive) endocytosis in human blood platelets. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* *24*, 169–178.
- Bem, D., Smith, H., Banushi, B., Burden, J.J., White, I.J., Hanley, J., Jeremiah, N., Rieux-Laucat, F., Bettels, R., Ariceta, G., et al.** (2015). VPS33B regulates protein sorting into and maturation of α -granule progenitor organelles in mouse megakaryocytes. *Blood* *126*, 133–143.
- Bennett, J.S., and Vilaire, G.** (1979). Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J. Clin. Invest.* *64*, 1393–1401.
- Bennett, P.C., Silverman, S.H., Gill, P.S., and Lip, G.Y.H.** (2009). Peripheral arterial disease and Virchow's triad. *Thromb. Haemost.* *101*, 1032–1040.
- 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. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1569–1579.
- Berthet, J., Damien, P., Hamzeh-Cognasse, H., Pozzetto, B., Garraud, O., and Cognasse, F.** (2010). Toll-like receptor 4 signal transduction in platelets: novel pathways. *Br. J. Haematol.* *151*, 89–92.
- Berwick, D.C., Dell, G.C., Welsh, G.I., Heesom, K.J., Hers, I., Fletcher, L.M.,**

- Cooke, F.T., and Tavaré, J.M.** (2004). Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles. *J. Cell Sci.* *117*, 5985–5993.
- Billecliff, P.G., and Lowe, M.** (2014). Inositol lipid phosphatases in membrane trafficking and human disease. *Biochem. J.* *461*, 159–175.
- Billich, A.** (2007). Drug evaluation: apilimod, an oral IL-12/IL-23 inhibitor for the treatment of autoimmune diseases and common variable immunodeficiency. *IDrugs Investig. Drugs J.* *10*, 53–59.
- Bizzozero, G.** (1882). Ueber einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung. *Arch. Fu'r pathologische Anat. Physiol. Fu'r Klin. Med.* 261–332.
- Blagoveshchenskaya, A., and Mayinger, P.** (2009). SAC1 lipid phosphatase and growth control of the secretory pathway. *Mol. Biosyst.* *5*, 36–42.
- Blair, P., and Flaumenhaft, R.** (2009). Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* *23*, 177–189.
- Blero, D., Payrastra, B., Schurmans, S., and Erneux, C.** (2007). Phosphoinositide phosphatases in a network of signalling reactions. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* *455*, 31–44.
- Boal, F., Mansour, R., Gayral, M., Saland, E., Chicanne, G., Xuereb, J.-M., Marcellin, M., Burlet-Schiltz, O., Sansonetti, P.J., Payrastra, B., et al.** (2015). TOM1 is a PI5P effector involved in the regulation of endosomal maturation. *J. Cell Sci.* *128*, 815–827.
- Boal, F., Puhar, A., Xuereb, J.-M., Kunduzova, O., Sansonetti, P.J., Payrastra, B., and Tronchère, H.** (2016). PI5P Triggers ICAM-1 Degradation in Shigella Infected Cells, Thus Dampening Immune Cell Recruitment. *Cell Rep.* *14*, 750–759.
- Boilard, E., Blanco, P., and Nigrovic, P.A.** (2012). Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* *8*, 534–542.
- 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. *Nat. Genet.* *25*, 17–19.
- Bonifacino, J.S., and Rojas, R.** (2006). Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 568–579.
- Bottega, R., Pecci, A., De Candia, E., Pujol-Moix, N., Heller, P.G., Noris, P., De Rocco, D., Podda, G.M., Glembotsky, A.C., Cattaneo, M., et al.** (2013). Correlation between platelet phenotype and NBEAL2 genotype in patients with congenital thrombocytopenia and α -granule deficiency. *Haematologica* *98*, 868–874.
- Breton-Gorius, J., Vainchenker, W., Nurden, A., Levy-Toledano, S., and Caen, J.** (1981). Defective alpha-granule production in megakaryocytes from gray platelet syndrome: ultrastructural studies of bone marrow cells and megakaryocytes growing in culture from blood precursors. *Am. J. Pathol.* *102*, 10–19.
- Broudy, V.C., and Kaushansky, K.** (1995). Thrombopoietin, the c-mpl ligand, is a major regulator of platelet production. *J. Leukoc. Biol.* *57*, 719–725.
- Bruno, S., Gunetti, M., Gammaitoni, L., Danè, A., Cavalloni, G., Sanavio, F., Fagioli, F., Aglietta, M., and Piacibello, W.** (2003). In vitro and in vivo megakaryocyte differentiation of fresh and ex-vivo expanded cord blood cells: rapid and

transient megakaryocyte reconstitution. *Haematologica* 88, 379–387.

Bua, D.J., Martin, G.M., Binda, O., and Gozani, O. (2013). Nuclear phosphatidylinositol-5-phosphate regulates ING2 stability at discrete chromatin targets in response to DNA damage. *Sci. Rep.* 3, 2137.

Buchanan, G.R., and Handin, R.I. (1976). Platelet function in the Chediak-Higashi syndrome. *Blood* 47, 941–948.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15060–15065.

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. *J. Biol. Chem.* 283, 8678–8686.

Burgoyne, R.D., and Morgan, A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiol. Rev.* 83, 581–632.

C

Cabezas, A., Pattni, K., and Stenmark, H. (2006). Cloning and subcellular localization of a human phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase, PIKfyve/Fab1. *Gene* 371, 34–41.

Cai, X., Xu, Y., Cheung, A.K., Tomlinson, R.C., Alcázar-Román, A., Murphy, L., Billich, A., Zhang, B., Feng, Y., Klumpp, M., et al. (2013). PIKfyve, a class III PI kinase, is the target of the small molecular IL-12/IL-23 inhibitor apilimod and a player in Toll-like receptor signaling. *Chem. Biol.* 20, 912–921.

Cai, X., Xu, Y., Kim, Y.-M., Loureiro, J., and Huang, Q. (2014). PIKfyve, a class III lipid kinase, is required for TLR-induced

type I IFN production via modulation of ATF3. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 192, 3383–3389.

Carricaburu, V., Lamia, K.A., Lo, E., Favereaux, L., Payrastre, B., Cantley, L.C., and Rameh, L.E. (2003). The phosphatidylinositol (PI)-5-phosphate 4-kinase type II enzyme controls insulin signaling by regulating PI-3,4,5-trisphosphate degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9867–9872.

Carty, S.E., Johnson, R.G., and Scarpa, A. (1981). Serotonin transport in isolated platelet granules. Coupling to the electrochemical proton gradient. *J. Biol. Chem.* 256, 11244–11250.

Certain, S., Barrat, F., Pastural, E., Le Deist, F., Goyo-Rivas, J., Jabado, N., Benkerrou, M., Seger, R., Vilmer, E., Beullier, G., et al. (2000). Protein truncation test of LYST reveals heterogenous mutations in patients with Chediak-Higashi syndrome. *Blood* 95, 979–983.

Chang, Y., Bluteau, D., Debili, N., and Vainchenker, W. (2007). From hematopoietic stem cells to platelets. *J. Thromb. Haemost. JTH 5 Suppl 1*, 318–327.

Chen, Y., Aardema, J., Kale, S., Whichard, Z.L., Awomolo, A., Blanchard, E., Chang, B., Myers, D.R., Ju, L., Tran, R., et al. (2013a). Loss of the F-BAR protein CIP4 reduces platelet production by impairing membrane-cytoskeleton remodeling. *Blood* 122, 1695–1706.

Chen, Y., Aardema, J., and Corey, S.J. (2013b). Biochemical and functional significance of F-BAR domain proteins interaction with WASP/N-WASP. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 280–286.

Chicanne, G., Severin, S., Boscheron, C., Terrisse, A.-D., Gratacap, M.-P., Gaits-Iacovoni, F., Tronchère, H., and Payrastre, B. (2012). A novel mass assay to quantify the bioactive lipid PtdIns3 *P* in

various biological samples. *Biochem. J.* 447, 17–23.

Choi, E.S., Nichol, J.L., Hokom, M.M., Hornkohl, A.C., and Hunt, P. (1995). Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 85, 402–413.

Chou, S.T., Khandros, E., Bailey, L.C., Nichols, K.E., Vakoc, C.R., Yao, Y., Huang, Z., Crispino, J.D., Hardison, R.C., Blobel, G.A., et al. (2009). Graded repression of PU.1/Sfp1 gene transcription by GATA factors regulates hematopoietic cell fate. *Blood* 114, 983–994.

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.

Clarke, J.H., and Irvine, R.F. (2013). Evolutionarily conserved structural changes in phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase (PI5P4K) isoforms are responsible for differences in enzyme activity and localization. *Biochem. J.* 454, 49–57.

Clemetson, K.J., and Clemetson, J.M. (1995). Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin. Thromb. Hemost.* 21, 130–136.

Cognasse, F., Hamzeh, H., Chavarin, P., Acquart, S., Genin, C., and Garraud, O. (2005). Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol. Cell Biol.* 83, 196–198.

Coronas, S., Ramel, D., Pendaries, C., Gaits-Iacovoni, F., Tronchère, H., and Payrastre, B. (2007). PtdIns5P: a little phosphoinositide with big functions? *Biochem. Soc. Symp.* 117–128.

Coronas, S., Lagarrigue, F., Ramel, D., Chicanne, G., Delsol, G., Payrastre, B.,

and Tronchère, H. (2008). Elevated levels of PtdIns5P in NPM-ALK transformed cells: implication of PIKfyve. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 351–355.

Cosemans, J.M.E.M., Angelillo-Scherrer, A., Mattheij, N.J.A., and Heemskerk, J.W.M. (2013). The effects of arterial flow on platelet activation, thrombus growth, and stabilization. *Cardiovasc. Res.* 99, 342–352.

Coughlin, S.R. (1999). How the protease thrombin talks to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11023–11027.

Cramer, E.M., Debili, N., Martin, J.F., Gladwin, A.M., Breton-Gorius, J., Harrison, P., Savidge, G.F., and Vainchenker, W. (1989). Uncoordinated expression of fibrinogen compared with thrombospondin and von Willebrand factor in maturing human megakaryocytes. *Blood* 73, 1123–1129.

Cramer, E.M., Norol, F., Guichard, J., Breton-Gorius, J., Vainchenker, W., Massé, J.M., and Debili, N. (1997). Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood* 89, 2336–2346.

Cullinane, A.R., Straatman-Iwanowska, A., Seo, J.K., Ko, J.S., Song, K.S., Gizewska, M., Gruszfeld, D., Gliwicz, D., Tuysuz, B., Erdemir, G., et al. (2009). Molecular investigations to improve diagnostic accuracy in patients with ARC syndrome. *Hum. Mutat.* 30, E330–E337.

D

Dall’Armi, C., Devereaux, K.A., and Di Paolo, G. (2013). The role of lipids in the control of autophagy. *Curr. Biol. CB* 23, R33–R45.

Datta, N.S., Williams, J.L., Caldwell, J., Curry, A.M., Ashcraft, E.K., and Long, M.W. (1996). Novel alterations in CDK1/cyclin B1 kinase complex formation

occur during the acquisition of a polyploid DNA content. *Mol. Biol. Cell* 7, 209–223.

Davì, G., and Patrono, C. (2007). Platelet activation and atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.* 357, 2482–2494.

Deal, J.E., Barratt, T.M., and Dillon, M.J. (1990). Fanconi syndrome, ichthyosis, dysmorphism, jaundice and diarrhoea—a new syndrome. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 4, 308–313.

Dell’Angelica, E.C., Shotelersuk, V., Aguilar, R.C., Gahl, W.A., and Bonifacino, J.S. (1999). Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol. Cell* 3, 11–21.

Denis, M.M., Tolley, N.D., Bunting, M., Schwertz, H., Jiang, H., Lindemann, S., Yost, C.C., Rubner, F.J., Albertine, K.H., Swoboda, K.J., et al. (2005). Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 122, 379–391.

Deppermann, C., Cherpokova, D., Nurden, P., Schulz, J.-N., Thielmann, I., Kraft, P., Vögtle, T., Kleinschnitz, C., Dütting, S., Krohne, G., et al. (2013). Gray platelet syndrome and defective thrombo-inflammation in Nbeal2-deficient mice. *J. Clin. Invest.*

Deuel, T.F., Senior, R.M., Chang, D., Griffin, G.L., Henrikson, R.L., and Kaiser, E.T. (1981). Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4584–4587.

Deutsch, V.R., Olson, T.A., Nagler, A., Slavin, S., Levine, R.F., and Eldor, A. (1995). The response of cord blood megakaryocyte progenitors to IL-3, IL-6 and aplastic canine serum varies with gestational age. *Br. J. Haematol.* 89, 8–16.

Di Lello, P., Nguyen, B.D., Jones, T.N., Potempa, K., Kobor, M.S., Legault, P., and Omichinski, J.G. (2005). NMR structure of the amino-terminal domain from the Tfb1 subunit of TFIIH and characterization of its phosphoinositide and VP16 binding sites. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 7678–7686.

Di Pietro, S.M., Falcón-Pérez, J.M., and Dell’Angelica, E.C. (2004). Characterization of BLOC-2, a complex containing the Hermansky-Pudlak syndrome proteins HPS3, HPS5 and HPS6. *Traffic Cph. Den.* 5, 276–283.

Doerks, T., Strauss, M., Brendel, M., and Bork, P. (2000). GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. *Trends Biochem. Sci.* 25, 483–485.

Dominguez, V., Raimondi, C., Somanath, S., Bugliani, M., Loder, M.K., Edling, C.E., Divecha, N., da Silva-Xavier, G., Marselli, L., Persaud, S.J., et al. (2011). Class II phosphoinositide 3-kinase regulates exocytosis of insulin granules in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* 286, 4216–4225.

Dong, X., Shen, D., Wang, X., Dawson, T., Li, X., Zhang, Q., Cheng, X., Zhang, Y., Weisman, L.S., Delling, M., et al. (2010). PI(3,5)P(2) controls membrane trafficking by direct activation of muco lipin Ca(2+) release channels in the endolysosome. *Nat. Commun.* 1, 38.

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.

Drachman, J.G., and Kaushansky, K. (1997). Dissecting the thrombopoietin receptor: functional elements of the Mpl cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2350–2355.

Drachman, J.G., Griffin, J.D., and Kaushansky, K. (1995). The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. *J. Biol. Chem.* *270*, 4979–4982.

Dupuis-Coronas, S., Lagarrigue, F., Ramel, D., Chicanne, G., Saland, E., Gaits-Iacovoni, F., Payrastra, B., and Tronchère, H. (2011). The nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase oncogene interacts, activates, and uses the kinase PIKfyve to increase invasiveness. *J. Biol. Chem.* *286*, 32105–32114.

E

Eckly, A., Heijnen, H., Pertuy, F., Geerts, W., Proamer, F., Rinckel, J.-Y., Léon, C., Lanza, F., and Gachet, C. (2014). Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood* *123*, 921–930.

Ellson, C., Davidson, K., Anderson, K., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (2006). PtdIns3P binding to the PX domain of p40phox is a physiological signal in NADPH oxidase activation. *EMBO J.* *25*, 4468–4478.

Engelmann, B., and Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 34–45.

Er, E.E., Mendoza, M.C., Mackey, A.M., Rameh, L.E., and Blenis, J. (2013). AKT facilitates EGFR trafficking and degradation by phosphorylating and activating PIKfyve. *Sci. Signal.* *6*, ra45.

Erpenbeck, L., and Schön, M.P. (2010). Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood* *115*, 3427–3436.

F

Falasca, M., Hughes, W.E., Dominguez, V., Sala, G., Fostira, F., Fang, M.Q., Cazzolli, R., Shepherd, P.R., James, D.E., and Maffucci, T. (2007). The role of

phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling. *J. Biol. Chem.* *282*, 28226–28236.

Falcón-Pérez, J.M., Starcevic, M., Gautam, R., and Dell’Angelica, E.C. (2002). BLOC-1, a novel complex containing the pallidin and muted proteins involved in the biogenesis of melanosomes and platelet-dense granules. *J. Biol. Chem.* *277*, 28191–28199.

Falguières, T., Luyet, P.-P., and Gruenberg, J. (2009). Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics. *Exp. Cell Res.* *315*, 1567–1573.

Feng, L., Seymour, A.B., Jiang, S., To, A., Peden, A.A., Novak, E.K., Zhen, L., Rusiniak, M.E., Eicher, E.M., Robinson, M.S., et al. (1999). The beta3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 323–330.

Flaumenhaft, R., Dilks, J.R., Rozenvayn, N., Monahan-Earley, R.A., Feng, D., and Dvorak, A.M. (2005). The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood* *105*, 3879–3887.

Foley, K., Boguslavsky, S., and Klip, A. (2011). Endocytosis, recycling, and regulated exocytosis of glucose transporter 4. *Biochemistry (Mosc.)* *50*, 3048–3061.

Forsberg, E.C., Serwold, T., Kogan, S., Weissman, I.L., and Passegué, E. (2006). New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt3+ multipotent hematopoietic progenitors. *Cell* *126*, 415–426.

Frojmovic, M.M., and Milton, J.G. (1982). Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiol. Rev.* *62*, 185–261.

Fuentes Q, E., Fuentes Q, F., Andrés, V., Pello, O.M., Font de Mora, J., and Palomo G, I. (2013). Role of platelets as mediators that link inflammation and thrombosis in atherosclerosis. *Platelets* 24, 255–262.

Futter, C.E., Collinson, L.M., Backer, J.M., and Hopkins, C.R. (2001). Human VPS34 is required for internal vesicle formation within multivesicular endosomes. *J. Cell Biol.* 155, 1251–1264.

G

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. *J. Cell Biol.* 143, 65–79.

Gasic, G.J., Gasic, T.B., and Stewart, C.C. (1968). Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 61, 46–52.

Gawaz, M., Langer, H., and May, A.E. (2005). Platelets in inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 115, 3378–3384.

Geddings, J.E., and Mackman, N. (2014). New players in haemostasis and thrombosis. *Thromb. Haemost.* 111, 570–574.

Geddis, A.E., Fox, N.E., Tkachenko, E., and Kaushansky, K. (2007). Endomitotic megakaryocytes that form a bipolar spindle exhibit cleavage furrow ingression followed by furrow regression. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 455–460.

Gee, J.A., Frausto, R.F., Chung, D.-W.D., Tangmonkongvoragul, C., Le, D.J., Wang, C., Han, J., and Aldave, A.J. (2015). Identification of novel PIKFYVE gene mutations associated with Fleck corneal dystrophy. *Mol. Vis.* 21, 1093–1100.

Gehring, E.-M., Lam, R.S., Siraskar, G., Koutsouki, E., Seebohm, G., Ureche, O.N., Ureche, L., Baltaev, R., Tavaré, J.M., and

Lang, F. (2009). PIKfyve upregulates CFTR activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 952–957.

Gerondopoulos, A., Langemeyer, L., Liang, J.-R., Linford, A., and Barr, F.A. (2012). BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Curr. Biol. CB* 22, 2135–2139.

Ghasemzadeh, M., and Hosseini, E. (2013). Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb. Res.* 131, 191–197.

Gissen, P., Johnson, C.A., Morgan, N.V., Stapelbroek, J.M., Forshew, T., Cooper, W.N., McKiernan, P.J., Klomp, L.W.J., Morris, A.A.M., Wraith, J.E., et al. (2004). Mutations in VPS33B, encoding a regulator of SNARE-dependent membrane fusion, cause arthrogryposis-renal dysfunction-cholestasis (ARC) syndrome. *Nat. Genet.* 36, 400–404.

Gissen, P., Tee, L., Johnson, C.A., Genin, E., Caliebe, A., Chitayat, D., Clericuzio, C., Denecke, J., Di Rocco, M., Fischler, B., et al. (2006). Clinical and molecular genetic features of ARC syndrome. *Hum. Genet.* 120, 396–409.

Golebiewska, E.M., and Poole, A.W. (2013). Secrets of platelet exocytosis - what do we really know about platelet secretion mechanisms? *Br. J. Haematol.*

Golebiewska, E.M., and Poole, A.W. (2015). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 29, 153–162.

van der Goot, F.G., and Gruenberg, J. (2006). Intra-endosomal membrane traffic. *Trends Cell Biol.* 16, 514–521.

Gordge, M.P. (2005). Megakaryocyte apoptosis: sorting out the signals. *Br. J. Pharmacol.* 145, 271–273.

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.

Graham, G.J., Ren, Q., Dilks, J.R., Blair, P., Whiteheart, S.W., and Flaumenhaft, R. (2009). Endobrevin/VAMP-8-dependent dense granule release mediates thrombus formation in vivo. *Blood* *114*, 1083–1090.

Griffiths, G., Matteoni, R., Back, R., and Hoflack, B. (1990). Characterization of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor-enriched prelysosomal compartment in NRK cells. *J. Cell Sci.* *95* (Pt 3), 441–461.

Grozovsky, R., Begonja, A.J., Liu, K., Visner, G., Hartwig, J.H., Falet, H., and Hoffmeister, K.M. (2015). The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat. Med.* *21*, 47–54.

Guerrero, J.A., Bennett, C., van der Weyden, L., McKinney, H., Chin, M., Nurden, P., McIntyre, Z., Cambridge, E.L., Estabel, J., Wardle-Jones, H., et al. (2014). Gray platelet syndrome: proinflammatory megakaryocytes and α -granule loss cause myelofibrosis and confer metastasis resistance in mice. *Blood* *124*, 3624–3635.

Guittard, G., Gérard, A., Dupuis-Coronas, S., Tronchère, H., Mortier, E., Favre, C., Olive, D., Zimmermann, P., Payrastre, B., and Nunès, J.A. (2009). Cutting edge: Dok-1 and Dok-2 adaptor molecules are regulated by phosphatidylinositol 5-phosphate production in T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *182*, 3974–3978.

Guittard, G., Mortier, E., Tronchère, H., Firaguay, G., Gérard, A., Zimmermann, P., Payrastre, B., and Nunès, J.A. (2010).

Evidence for a positive role of PtdIns5P in T-cell signal transduction pathways. *FEBS Lett.* *584*, 2455–2460.

Gunay-Aygun, M., Huizing, M., and Gahl, W.A. (2004). Molecular defects that affect platelet dense granules. *Semin. Thromb. Hemost.* *30*, 537–547.

Gunay-Aygun, M., Zivony-Elboum, Y., Gumruk, F., Geiger, D., Cetin, M., Khayat, M., Kleta, R., Kfir, N., Anikster, Y., Chezar, J., et al. (2010). Gray platelet syndrome: natural history of a large patient cohort and locus assignment to chromosome 3p. *Blood* *116*, 4990–5001.

Gunay-Aygun, M., Falik-Zaccai, T.C., Vilboux, T., Zivony-Elboum, Y., Gumruk, F., Cetin, M., Khayat, M., Boerkoel, C.F., Kfir, N., Huang, Y., et al. (2011). NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet α -granules. *Nat. Genet.* *43*, 732–734.

Gupta, A., Toscano, S., Trivedi, D., Jones, D.R., Mathre, S., Clarke, J.H., Divecha, N., and Raghu, P. (2013). Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase (PIP4K) regulates TOR signaling and cell growth during *Drosophila* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 5963–5968.

H

Haddad, E., Cramer, E., Rivière, C., Rameau, P., Louache, F., Guichard, J., Nelson, D.L., Fischer, A., Vainchenker, W., and Debili, N. (1999). The thrombocytopenia of Wiskott Aldrich syndrome is not related to a defect in proplatelet formation. *Blood* *94*, 509–518.

Han, B.-K., and Emr, S.D. (2011). Phosphoinositide [PI(3,5)P₂] lipid-dependent regulation of the general transcriptional regulator Tup1. *Genes Dev.* *25*, 984–995.

- Han, B.-K., and Emr, S.D.** (2013). The phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P₂)-dependent Tup1 conversion (PIPTC) regulates metabolic reprogramming from glycolysis to gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* *288*, 20633–20645.
- Han, Z.C., Bellucci, S., and Caen, J.P.** (1991). Megakaryocytopoiesis: characterization and regulation in normal and pathologic states. *Int. J. Hematol.* *54*, 3–14.
- Handagama, P., Scarborough, R.M., Shuman, M.A., and Bainton, D.F.** (1993). Endocytosis of fibrinogen into megakaryocyte and platelet alpha-granules is mediated by alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa). *Blood* *82*, 135–138.
- Hantgan, R.R.** (1988). Fibrin protofibril and fibrinogen binding to ADP-stimulated platelets: evidence for a common mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* *968*, 24–35.
- Harrison, P., and Cramer, E.M.** (1993). Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* *7*, 52–62.
- Harrison, P., Savidge, G.F., and Cramer, E.M.** (1990). The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins. *Br. J. Haematol.* *74*, 125–130.
- Haugsten, E.M., Oppelt, A., and Wesche, J.** (2013). Phosphatidylinositol 5-phosphate is a second messenger important for cell migration. *Commun. Integr. Biol.* *6*, e25446.
- Hayakawa, N., Noguchi, M., Takeshita, S., Eviryanti, A., Seki, Y., Nishio, H., Yokoyama, R., Noguchi, M., Shuto, M., Shima, Y., et al.** (2014). Structure-activity relationship study, target identification, and pharmacological characterization of a small molecular IL-12/23 inhibitor, APY0201. *Bioorg. Med. Chem.* *22*, 3021–3029.
- Hegy, E., Heilbrun, L.K., and Nakeff, A.** (1990). Immunogold probing of platelet factor 4 in different ploidy classes of rat megakaryocytes sorted by flow cytometry. *Exp. Hematol.* *18*, 789–793.
- Heijnen, H., and van der Sluijs, P.** (2015). Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J. Thromb. Haemost. JTH* *13*, 2141–2151.
- Heijnen, H.F., Debili, N., Vainchenker, W., Breton-Gorius, J., Geuze, H.J., and Sixma, J.J.** (1998). Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood* *91*, 2313–2325.
- Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., and Sixma, J.J.** (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* *94*, 3791–3799.
- Heilmann, E., Hynes, L.A., Friese, P., George, I.N., Burstein, S.A., and Dale, G.L.** (1994). Dog platelets accumulate intracellular fibrinogen as they age. *J. Cell. Physiol.* *161*, 23–30.
- Henn, V., Slupsky, J.R., Gräfe, M., Anagnostopoulos, I., Förster, R., Müller-Berghaus, G., and Kroczeck, R.A.** (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* *391*, 591–594.
- Hermann, A., Rauch, B.H., Braun, M., Schrör, K., and Weber, A.A.** (2001). Platelet CD40 ligand (CD40L)--subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets* *12*, 74–82.
- Hill, E.V., Hudson, C.A., Vertommen, D., Rider, M.H., and Tavaré, J.M.** (2010). Regulation of PIKfyve phosphorylation by insulin and osmotic stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *397*, 650–655.

Hirano, T., Munnik, T., and Sato, M.H. (2015). Phosphatidylinositol 3-Phosphate 5-Kinase, FAB1/PIKfyve Kinase Mediates Endosome Maturation to Establish Endosome-Cortical Microtubule Interaction in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *169*, 1961–1974.

Ho, M.S.H., Medcalf, R.L., Livesey, S.A., and Traianedes, K. (2015). The dynamics of adult haematopoiesis in the bone and bone marrow environment. *Br. J. Haematol.* *170*, 472–486.

Hollopeter, G., Jantzen, H.M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R.B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D., et al. (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* *409*, 202–207.

Holmsen, H., and Weiss, H.J. (1979). Secretory storage pools in platelets. *Annu. Rev. Med.* *30*, 119–134.

Huang, H.-S., and Chang, H.-H. (2012). Platelets in inflammation and immune modulations: functions beyond hemostasis. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* *60*, 443–451.

Huang, S., and Czech, M.P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab.* *5*, 237–252.

Huang, J.-S., Ramamurthy, S.K., Lin, X., and Le Breton, G.C. (2004). Cell signalling through thromboxane A₂ receptors. *Cell. Signal.* *16*, 521–533.

Hughes, W.E., Cooke, F.T., and Parker, P.J. (2000). Sac phosphatase domain proteins. *Biochem. J.* *350 Pt 2*, 337–352.

Huizing, M., Anikster, Y., and Gahl, W.A. (2001). Hermansky-Pudlak syndrome and Chediak-Higashi syndrome: disorders of vesicle formation and trafficking. *Thromb. Haemost.* *86*, 233–245.

Huizing, M., Helip-Wooley, A., Westbroek, W., Gunay-Aygun, M., and Gahl, W.A. (2008). Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *9*, 359–386.

Huizing, M., Pederson, B., Hess, R.A., Griffin, A., Helip-Wooley, A., Westbroek, W., Dorward, H., O'Brien, K.J., Golas, G., Tsilou, E., et al. (2009). Clinical and cellular characterisation of Hermansky-Pudlak syndrome type 6. *J. Med. Genet.* *46*, 803–810.

von Hundelshausen, P., Weber, K.S., Huo, Y., Proudfoot, A.E., Nelson, P.J., Ley, K., and Weber, C. (2001). RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* *103*, 1772–1777.

I

Ichikawa, M., Asai, T., Saito, T., Seo, S., Yamazaki, I., Yamagata, T., Mitani, K., Chiba, S., Ogawa, S., Kurokawa, M., et al. (2004). AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat. Med.* *10*, 299–304.

Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., and Shisheva, A. (2001). Mammalian cell morphology and endocytic membrane homeostasis require enzymatically active phosphoinositide 5-kinase PIKfyve. *J. Biol. Chem.* *276*, 26141–26147.

Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., Mlak, K., and Shisheva, A. (2002a). Requirement for PIKfyve enzymatic activity in acute and long-term insulin cellular effects. *Endocrinology* *143*, 4742–4754.

Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., Mlak, K., Kanzaki, M., Pessin, J., and Shisheva, A. (2002b). Functional dissection of lipid and protein kinase signals of PIKfyve reveals the role of PtdIns 3,5-P₂ production for

endomembrane integrity. *J. Biol. Chem.* 277, 9206–9211.

Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., Mlak, K., Deeb, R., Fligger, J., Soans, A., Finley, R.L., and Shisheva, A. (2003a). Active PIKfyve associates with and promotes the membrane attachment of the late endosome-to-trans-Golgi network transport factor Rab9 effector p40. *J. Biol. Chem.* 278, 50863–50871.

Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., Foti, M., Carpentier, J.-L., and Shisheva, A. (2003b). PIKfyve controls fluid phase endocytosis but not recycling/degradation of endocytosed receptors or sorting of procathepsin D by regulating multivesicular body morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* 14, 4581–4591.

Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., and Shisheva, A. (2006). Localized PtdIns 3,5-P2 synthesis to regulate early endosome dynamics and fusion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C393–C404.

Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., Dondapati, R., and Shisheva, A. (2007). ArPIKfyve-PIKfyve interaction and role in insulin-regulated GLUT4 translocation and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Exp. Cell Res.* 313, 2404–2416.

Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., Ijuin, T., Takenawa, T., and Shisheva, A. (2009a). Sac3 is an insulin-regulated phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate phosphatase: gain in insulin responsiveness through Sac3 down-regulation in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 284, 23961–23971.

Ikonomov, O.C., Fligger, J., Sbrissa, D., Dondapati, R., Mlak, K., Deeb, R., and Shisheva, A. (2009b). Kinesin adapter JLP links PIKfyve to microtubule-based endosome-to-trans-Golgi network traffic of furin. *J. Biol. Chem.* 284, 3750–3761.

Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., and Shisheva, A. (2009c). YM201636, an

inhibitor of retroviral budding and PIKfyve-catalyzed PtdIns(3,5)P2 synthesis, halts glucose entry by insulin in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382, 566–570.

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. *J. Biol. Chem.* 285, 26760–26764.

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^{-/-} embryos but normality of PIKfyve^{+/-} mice. *J. Biol. Chem.* 286, 13404–13413.

Ikonomov, O.C., Sbrissa, D., Delvecchio, K., Feng, H.-Z., Cartee, G.D., Jin, J.-P., and Shisheva, A. (2013). Muscle-specific Pikfyve gene disruption causes glucose intolerance, insulin resistance, adiposity, and hyperinsulinemia but not muscle fiber-type switching. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305, E119–E131.

Imamura, N., Mtasiwa, D.M., Inada, T., and Kuramoto, A. (1990a). Different expression of CD36 antigen molecule on the surface of megakaryocyte lineage leukemias and megakaryocyte leukemia cell lines MEG-01 and HEL. *Leukemia* 4, 525–528.

Imamura, N., Mtasiwa, D.M., Inada, T., Kuramoto, A., Ogura, M., and Saito, H. (1990b). Varied expressions of receptors on the human megakaryoblastic cell line MEG-01 by monoclonal antibodies. *Am. J. Hematol.* 34, 154–156.

Italiano, J.E., Lecine, P., Shivdasani, R.A., and Hartwig, J.H. (1999). Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by

differentiated megakaryocytes. *J. Cell Biol.* *147*, 1299–1312.

Italiano, J.E., Richardson, J.L., Patel-Hett, S., Battinelli, E., Zaslavsky, A., Short, S., Ryeom, S., Folkman, J., and Klement, G.L. (2008). Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood* *111*, 1227–1233.

Ito, T., Ishida, Y., Kashiwagi, R., and Kuriya, S. (1996). Recombinant human c-Mpl ligand is not a direct stimulator of proplatelet formation in mature human megakaryocytes. *Br. J. Haematol.* *94*, 387–390.

Ivanciu, L., and Stalker, T.J. (2015). Spatiotemporal regulation of coagulation and platelet activation during the hemostatic response *in vivo*. *J. Thromb. Haemost.* *13*, 1949–1959.

J

Jackson, S.P. (2007). The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* *109*, 5087–5095.

Jackson, S.P. (2011). Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat. Med.* *17*, 1423–1436.

Jefferies, H.B.J., Cooke, F.T., Jat, P., Boucheron, C., Koizumi, T., Hayakawa, M., Kaizawa, H., Ohishi, T., Workman, P., Waterfield, M.D., et al. (2008). A selective PIKfyve inhibitor blocks PtdIns(3,5)P(2) production and disrupts endomembrane transport and retroviral budding. *EMBO Rep.* *9*, 164–170.

Jin, J., Daniel, J.L., and Kunapuli, S.P. (1998). Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J. Biol. Chem.* *273*, 2030–2034.

Jogl, G., Shen, Y., Gebauer, D., Li, J., Wiegmann, K., Kashkar, H., Krönke, M., and Tong, L. (2002). Crystal structure of the BEACH domain reveals an unusual fold and extensive association with a novel PH domain. *EMBO J.* *21*, 4785–4795.

Johnson, E.E., Overmeyer, J.H., Gunning, W.T., and Maltese, W.A. (2006). Gene silencing reveals a specific function of hVps34 phosphatidylinositol 3-kinase in late versus early endosomes. *J. Cell Sci.* *119*, 1219–1232.

Jones, D.R., Bultsma, Y., Keune, W.-J., Halstead, J.R., Elouarrat, D., Mohammed, S., Heck, A.J., D'Santos, C.S., and Divecha, N. (2006). Nuclear PtdIns5P as a transducer of stress signaling: an *in vivo* role for PIP4Kbeta. *Mol. Cell* *23*, 685–695.

Jones, D.R., Foulger, R., Keune, W.-J., Bultsma, Y., and Divecha, N. (2013). PtdIns5P is an oxidative stress-induced second messenger that regulates PKB activation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *27*, 1644–1656.

Jordan, C.T., and Lemischka, I.R. (1990). Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev.* *4*, 220–232.

Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Gorge, T., Krueger, A., Wagner, D.D., Graf, T., Italiano, J.E., Shivdasani, R.A., et al. (2007). Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* *317*, 1767–1770.

K

Kahr, W.H.A., Hinckley, J., Li, L., Schwertz, H., Christensen, H., Rowley, J.W., Pluthero, F.G., Urban, D., Fabbro, S., Nixon, B., et al. (2011). Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat. Genet.* *43*, 738–740.

- Kahr, W.H.A., Lo, R.W., Li, L., Pluthero, F.G., Christensen, H., Ni, R., Vaezzadeh, N., Hawkins, C.E., Weyrich, A.S., Di Paola, J., et al.** (2013). Abnormal megakaryocyte development and platelet function in Nbeal2(-/-) mice. *Blood* *122*, 3349–3358.
- Kaplan, Z.S., and Jackson, S.P.** (2011). The role of platelets in atherothrombosis. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2011*, 51–61.
- Kaplan, J., De Domenico, I., and Ward, D.M.** (2008). Chediak-Higashi syndrome. *Curr. Opin. Hematol.* *15*, 22–29.
- Karachaliou, N., Pilotto, S., Bria, E., and Rosell, R.** (2015). Platelets and their role in cancer evolution and immune system. *Transl. Lung Cancer Res.* *4*, 713–720.
- Karim, M.A., Nagle, D.L., Kandil, H.H., Bürger, J., Moore, K.J., and Spritz, R.A.** (1997). Mutations in the Chediak-Higashi syndrome gene (CHS1) indicate requirement for the complete 3801 amino acid CHS protein. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 1087–1089.
- Karpatkin, S., and Pearlstein, E.** (1981). Role of platelets in tumor cell metastases. *Ann. Intern. Med.* *95*, 636–641.
- Kaushansky, K.** (1994). The mpl ligand: molecular and cellular biology of the critical regulator of megakaryocyte development. *Stem Cells Dayt. Ohio 12 Suppl 1*, 91–96; discussion 96–97.
- Kaushansky, K.** (1995). Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* *86*, 419–431.
- Kaushansky, K.** (2005). The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J. Clin. Invest.* *115*, 3339–3347.
- Kaushansky, K., and Drachman, J.G.** (2002). The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Oncogene* *21*, 3359–3367.
- Kaushansky, K., Lok, S., Holly, R.D., Broudy, V.C., Lin, N., Bailey, M.C., Forstrom, J.W., Buddle, M.M., Oort, P.J., and Hagen, F.S.** (1994). Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* *369*, 568–571.
- Kawasaki, S., Yamasaki, K., Nakagawa, H., Shinomiya, K., Nakatsukasa, M., Nakai, Y., and Kinoshita, S.** (2012). A novel mutation (p.Glu1389AspfsX16) of the phosphoinositide kinase, FYVE finger containing gene found in a Japanese patient with fleck corneal dystrophy. *Mol. Vis.* *18*, 2954–2960.
- Kerk, D., and Moorhead, G.B.G.** (2010). A phylogenetic survey of myotubularin genes of eukaryotes: distribution, protein structure, evolution, and gene expression. *BMC Evol. Biol.* *10*, 196.
- Ketel, K., Krauss, M., Nicot, A.-S., Puchkov, D., Wieffer, M., Müller, R., Subramanian, D., Schultz, C., Laporte, J., and Haucke, V.** (2016). A phosphoinositide conversion mechanism for exit from endosomes. *Nature* *529*, 408–412.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y.** (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *152*, 519–530.
- Kim, J., Jahng, W.J., Di Vizio, D., Lee, J.S., Jhaveri, R., Rubin, M.A., Shisheva, A., and Freeman, M.R.** (2007). The phosphoinositide kinase PIKfyve mediates epidermal growth factor receptor trafficking to the nucleus. *Cancer Res.* *67*, 9229–9237.
- Kim, S.M., Chang, H.K., Song, J.W., Koh, H., Han, S.J., and Severance Pediatric Liver Disease Research Group** (2010). Agranular platelets as a cardinal feature of

ARC syndrome. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* *32*, 253–258.

King, S.M., and Reed, G.L. (2002). Development of platelet secretory granules. *Semin. Cell Dev. Biol.* *13*, 293–302.

Kirito, K., Fox, N., Komatsu, N., and Kaushansky, K. (2005). Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1 α . *Blood* *105*, 4258–4263.

Klaus, F., Laufer, J., Czarkowski, K., Strutz-Seebohm, N., Seebohm, G., and Lang, F. (2009). PIKfyve-dependent regulation of the Cl⁻ channel CIC-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *381*, 407–411.

Kosaki, G. (2005). In vivo platelet production from mature megakaryocytes: does platelet release occur via proplatelets? *Int. J. Hematol.* *81*, 208–219.

Kotoulas, A., Kokotas, H., Kopsidas, K., Droutsas, K., Grigoriadou, M., Bajrami, H., Schorderet, D.F., and Petersen, M.B. (2011). A novel PIKfyve mutation in fleck corneal dystrophy. *Mol. Vis.* *17*, 2776–2781.

Kulkarni, S., Dopheide, S.M., Yap, C.L., Ravanat, C., Freund, M., Mangin, P., Heel, K.A., Street, A., Harper, I.S., Lanza, F., et al. (2000). A revised model of platelet aggregation. *J. Clin. Invest.* *105*, 783–791.

Kuter, D.J., Gminski, D.M., and Rosenberg, R.D. (1992). Transforming growth factor beta inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. *Blood* *79*, 619–626.

L

Labelle, M., Begum, S., and Hynes, R.O. (2011). Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* *20*, 576–590.

Labelle, M., Begum, S., and Hynes, R.O. (2014). Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E3053–E3061.

Lamia, K.A., Peroni, O.D., Kim, Y.-B., Rameh, L.E., Kahn, B.B., and Cantley, L.C. (2004). Increased insulin sensitivity and reduced adiposity in phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase beta^{-/-} mice. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 5080–5087.

Langer, H.F., Choi, E.Y., Zhou, H., Schleicher, R., Chung, K.-J., Tang, Z., Göbel, K., Bdeir, K., Chatzigeorgiou, A., Wong, C., et al. (2012). Platelets contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Circ. Res.* *110*, 1202–1210.

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. *Nat. Genet.* *13*, 175–182.

Laporte, J., Biancalana, V., Tanner, S.M., Kress, W., Schneider, V., Wallgren-Pettersson, C., Herger, F., Buj-Bello, A., Blondeau, F., Liechti-Gallati, S., et al. (2000). MTM1 mutations in X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mutat.* *15*, 393–409.

de Lartigue, J., Polson, H., Feldman, M., Shokat, K., Tooze, S.A., Urbé, S., and Clague, M.J. (2009). PIKfyve regulation of endosome-linked pathways. *Traffic Cph. Den.* *10*, 883–893.

Lecine, P., and Shivdasani, R.A. (1998). Cellular and molecular biology of megakaryocyte differentiation in the absence of lineage-restricted transcription factors. *Stem Cells Dayt. Ohio* *16 Suppl 2*, 91–95.

Lecine, P., Villeval, J.L., Vyas, P., Swencki, B., Xu, Y., and Shivdasani, R.A. (1998). Mice lacking transcription factor

NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes. *Blood* 92, 1608–1616.

Lecompte, O., Poch, O., and Laporte, J. (2008). PtdIns5P regulation through evolution: roles in membrane trafficking? *Trends Biochem. Sci.* 33, 453–460.

Lemons, P.P., Chen, D., Bernstein, A.M., Bennett, M.K., and Whiteheart, S.W. (1997). Regulated secretion in platelets: identification of elements of the platelet exocytosis machinery. *Blood* 90, 1490–1500.

Lenk, G.M., Ferguson, C.J., Chow, C.Y., Jin, N., Jones, J.M., Grant, A.E., Zolov, S.N., Winters, J.J., Giger, R.J., Dowling, J.J., et al. (2011). Pathogenic mechanism of the FIG4 mutation responsible for Charcot-Marie-Tooth disease CMT4J. *PLoS Genet.* 7, e1002104.

Leven, R.M., and Yee, M.K. (1987). Megakaryocyte morphogenesis stimulated in vitro by whole and partially fractionated thrombocytopenic plasma: a model system for the study of platelet formation. *Blood* 69, 1046–1052.

Li, Z., Delaney, M.K., O'Brien, K.A., and Du, X. (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2341–2349.

Li, N. (2013). CD4+ T cells in atherosclerosis: regulation by platelets. *Thromb. Haemost.* 109, 980–990.

Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliaris, C., Rodgers, L., McCombie, R., et al. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943–1947.

Li, S., Tiab, L., Jiao, X., Munier, F.L., Zografos, L., Frueh, B.E., Sergeev, Y., Smith, J., Rubin, B., Meallet, M.A., et al. (2005). Mutations in PIP5K3 are associated with François-Neetens mouchetée fleck corneal dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 54–63.

Li, X., Wang, X., Zhang, X., Zhao, M., Tsang, W.L., Zhang, Y., Yau, R.G.W., Weisman, L.S., and Xu, H. (2013). Genetically encoded fluorescent probe to visualize intracellular phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate localization and dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 21165–21170.

Lindemann, S., Tolley, N.D., Dixon, D.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., and Weyrich, A.S. (2001). Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J. Cell Biol.* 154, 485–490.

Liu, Y., Lai, Y.-C., Hill, E.V., Tyteca, D., Carpentier, S., Ingvaldsen, A., Vertommen, D., Lantier, L., Foretz, M., Dequiedt, F., et al. (2013). Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) is an AMPK target participating in contraction-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Biochem. J.* 455, 195–206.

Lo, B., Li, L., Gissen, P., Christensen, H., McKiernan, P.J., Ye, C., Abdelhaleem, M., Hayes, J.A., Williams, M.D., Chitayat, D., et al. (2005). Requirement of VPS33B, a member of the Sec1/Munc18 protein family, in megakaryocyte and platelet alpha-granule biogenesis. *Blood* 106, 4159–4166.

Lok, S., Kaushansky, K., Holly, R.D., Kuijper, J.L., Lofton-Day, C.E., Oort, P.J., Grant, F.J., Heipel, M.D., Burkhead, S.K., and Kramer, J.M. (1994). Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 369, 565–568.

Lordier, L., Jalil, A., Aurade, F., Larbret, F., Larghero, J., Debili, N., Vainchenker, W., and Chang, Y. (2008). Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood* *112*, 3164–3174.

Lordier, L., Bluteau, D., Jalil, A., Legrand, C., Pan, J., Rameau, P., Jouni, D., Bluteau, O., Mercher, T., Leon, C., et al. (2012). RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat. Commun.* *3*, 717.

Lorenzo, O., Urbé, S., and Clague, M.J. (2005). Analysis of phosphoinositide binding domain properties within the myotubularin-related protein MTMR3. *J. Cell Sci.* *118*, 2005–2012.

M

Machlus, K.R., and Italiano, J.E. (2013). The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J. Cell Biol.* *201*, 785–796.

Machlus, K.R., Thon, J.N., and Italiano, J.E. (2014). Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *Br. J. Haematol.* *165*, 227–236.

Mackman, N., Tilley, R.E., and Key, N.S. (2007). Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *27*, 1687–1693.

Maffucci, T., Brancaccio, A., Piccolo, E., Stein, R.C., and Falasca, M. (2003). Insulin induces phosphatidylinositol-3-phosphate formation through TC10 activation. *EMBO J.* *22*, 4178–4189.

Majerus, P.W., and York, J.D. (2009). Phosphoinositide phosphatases and disease. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S249–S254.

Mallik, R., and Gross, S.P. (2004). Molecular motors: strategies to get along. *Curr. Biol.* *CB 14*, R971–R982.

Marks, M.S. (2012). SNARing platelet granule secretion. *Blood* *120*, 2355–2357.

Martina, J.A., Moriyama, K., and Bonifacino, J.S. (2003). BLOC-3, a protein complex containing the Hermansky-Pudlak syndrome gene products HPS1 and HPS4. *J. Biol. Chem.* *278*, 29376–29384.

Masliah-Planchon, J., Darnige, L., and Bellucci, S. (2013). Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update. *Br. J. Haematol.* *160*, 5–11.

Mazharian, A., Mori, J., Wang, Y.-J., Heising, S., Neel, B.G., Watson, S.P., and Senis, Y.A. (2013). Megakaryocyte-specific deletion of the protein-tyrosine phosphatases Shp1 and Shp2 causes abnormal megakaryocyte development, platelet production, and function. *Blood* *121*, 4205–4220.

McConnachie, G., Pass, I., Walker, S.M., and Downes, C.P. (2003). Interfacial kinetic analysis of the tumour suppressor phosphatase, PTEN: evidence for activation by anionic phospholipids. *Biochem. J.* *371*, 947–955.

McEwen, R.K., Dove, S.K., Cooke, F.T., Painter, G.F., Holmes, A.B., Shisheva, A., Ohya, Y., Parker, P.J., and Michell, R.H. (1999). Complementation analysis in PtdInsP kinase-deficient yeast mutants demonstrates that *Schizosaccharomyces pombe* and murine Fab1p homologues are phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinases. *J. Biol. Chem.* *274*, 33905–33912.

McFadyen, J.D., and Jackson, S.P. (2013). Differentiating haemostasis from thrombosis for therapeutic benefit. *Thromb. Haemost.* *110*, 859–867.

McNicol, A., and Israels, S.J. (1999). Platelet dense granules: structure, function

and implications for haemostasis. *Thromb. Res.* 95, 1–18.

Meijer, H.J., Berrie, C.P., Iurisci, C., Divecha, N., Musgrave, A., and Munnik, T. (2001). Identification of a new polyphosphoinositide in plants, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P), and its accumulation upon osmotic stress. *Biochem. J.* 360, 491–498.

Meng, R., Wang, Y., Yao, Y., Zhang, Z., Harper, D.C., Heijnen, H.F.G., Sitaram, A., Li, W., Raposo, G., Weiss, M.J., et al. (2012). SLC35D3 delivery from megakaryocyte early endosomes is required for platelet dense granule biogenesis and is differentially defective in Hermansky-Pudlak syndrome models. *Blood* 120, 404–414.

Michell, R.H., Heath, V.L., Lemmon, M.A., and Dove, S.K. (2006). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: metabolism and cellular functions. *Trends Biochem. Sci.* 31, 52–63.

Min, S.H., Suzuki, A., Stalker, T.J., Zhao, L., Wang, Y., McKennan, C., Riese, M.J., Guzman, J.F., Zhang, S., Lian, L., et al. (2014). Loss of PIKfyve in platelets causes a lysosomal disease leading to inflammation and thrombosis in mice. *Nat. Commun.* 5, 4691.

Miyakawa, Y., Rojnuckarin, P., Habib, T., and Kaushansky, K. (2001). Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 2494–2502.

Moroi, M., Jung, S.M., Nomura, S., Sekiguchi, S., Ordinas, A., and Diaz-Ricart, M. (1997). Analysis of the involvement of the von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction in platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions. *Blood* 90, 4413–4424.

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 Lett.* 475, 57–60.

Müller, F., Mutch, N.J., Schenk, W.A., Smith, S.A., Esterl, L., Spronk, H.M., Schmidbauer, S., Gahl, W.A., Morrissey, J.H., and Renné, T. (2009). Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 139, 1143–1156.

Murata, Y., Yasumi, T., Shirakawa, R., Izawa, K., Sakai, H., Abe, J., Tanaka, N., Kawai, T., Oshima, K., Saito, M., et al. (2011). Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood* 118, 1225–1230.

Musselman, C.A., and Kutateladze, T.G. (2009). PHD fingers: epigenetic effectors and potential drug targets. *Mol. Interv.* 9, 314–323.

N

Nagata, Y., and Todokoro, K. (1995). Thrombopoietin induces activation of at least two distinct signaling pathways. *FEBS Lett.* 377, 497–501.

Nagle, D.L., Karim, M.A., Woolf, E.A., Holmgren, L., Bork, P., Misumi, D.J., McGrail, S.H., Dussault, B.J., Perou, C.M., Boissy, R.E., et al. (1996). Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nat. Genet.* 14, 307–311.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8660–8665.
- Ni, H., Denis, C.V., Subbarao, S., Degen, J.L., Sato, T.N., Hynes, R.O., and Wagner, D.D.** (2000). Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J. Clin. Invest.* *106*, 385–392.
- Nicot, A.-S., and Laporte, J.** (2008). Endosomal phosphoinositides and human diseases. *Traffic Cph. Den.* *9*, 1240–1249.
- 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*. *Mol. Biol. Cell* *17*, 3062–3074.
- 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. *EMBO J.* *21*, 5069–5078.
- Nieswandt, B., and Watson, S.P.** (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* *102*, 449–461.
- Nieswandt, B., Hafner, M., Echtenacher, B., and Männel, D.N.** (1999). Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* *59*, 1295–1300.
- Nieuwenhuis, H.K., Akkerman, J.W., and Sixma, J.J.** (1987). Patients with a prolonged bleeding time and normal aggregation tests may have storage pool deficiency: studies on one hundred six patients. *Blood* *70*, 620–623.
- Nishimura, S., Nagasaki, M., Kunishima, S., Sawaguchi, A., Sakata, A., Sakaguchi, H., Ohmori, T., Manabe, I., Italiano, J.E., Ryu, T., et al.** (2015). IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J. Cell Biol.* *209*, 453–466.
- van Nispen tot Pannerden, H., de Haas, F., Geerts, W., Posthuma, G., van Dijk, S., and Heijnen, H.F.G.** (2010). The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. *Blood* *116*, 1147–1156.
- Niswander, L.M., Fegan, K.H., Kingsley, P.D., McGrath, K.E., and Palis, J.** (2014). SDF-1 dynamically mediates megakaryocyte niche occupancy and thrombopoiesis at steady state and following radiation injury. *Blood* *124*, 277–286.
- Novak, E.K., Hui, S.W., and Swank, R.T.** (1984). Platelet storage pool deficiency in mouse pigment mutations associated with seven distinct genetic loci. *Blood* *63*, 536–544.
- Nurden, A.T., and Nurden, P.** (2015). Inherited disorders of platelet function: selected updates. *J. Thromb. Haemost. JTH* *13 Suppl 1*, S2–S9.
- Nutt, S.L., Metcalf, D., D’Amico, A., Polli, M., and Wu, L.** (2005). Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J. Exp. Med.* *201*, 221–231.

O

- Ogura, M., Morishima, Y., Ohno, R., Kato, Y., Hirabayashi, N., Nagura, H., and Saito, H.** (1985). Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome. *Blood* *66*, 1384–1392.
- Olson, T.S., Caselli, A., Otsuru, S., Hofmann, T.J., Williams, R., Paolucci, P., Dominici, M., and Horwitz, E.M.** (2013).

Megakaryocytes promote murine osteoblastic HSC niche expansion and stem cell engraftment after radioablative conditioning. *Blood* 121, 5238–5249.

Oppelt, A., Lobert, V.H., Haglund, K., Mackey, A.M., Rameh, L.E., Liestøl, K., Schink, K.O., Pedersen, N.M., Wenzel, E.M., Haugsten, E.M., et al. (2013). Production of phosphatidylinositol 5-phosphate via PIKfyve and MTMR3 regulates cell migration. *EMBO Rep.* 14, 57–64.

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242–245.

Osborne, S.L., Wen, P.J., Boucheron, C., Nguyen, H.N., Hayakawa, M., Kaizawa, H., Parker, P.J., Vitale, N., and Meunier, F.A. (2008). PIKfyve negatively regulates exocytosis in neurosecretory cells. *J. Biol. Chem.* 283, 2804–2813.

P

Parmley, R.T., Poon, M.C., Crist, W.M., and Malluh, A. (1979). Giant platelet granules in a child with the Chediak-Higashi syndrome. *Am. J. Hematol.* 6, 51–60.

Patel, S.R., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2005a). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest.* 115, 3348–3354.

Patel, S.R., Richardson, J.L., Schulze, H., Kahle, E., Galjart, N., Drabek, K., Shivdasani, R.A., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2005b). Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* 106, 4076–4085.

Patel-Hett, S., Richardson, J.L., Schulze, H., Drabek, K., Isaac, N.A., Hoffmeister, K., Shivdasani, R.A., Bulinski, J.C., Galjart, N., Hartwig, J.H., et al. (2008).

Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood* 111, 4605–4616.

Patel-Hett, S., Wang, H., Begonja, A.J., Thon, J.N., Alden, E.C., Wandersee, N.J., An, X., Mohandas, N., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2011). The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation. *Blood* 118, 1641–1652.

Pendaries, C., Tronchère, H., Arbibe, L., Mounier, J., Gozani, O., Cantley, L., Fry, M.J., Gaits-Iacovoni, F., Sansonetti, P.J., and Payrastre, B. (2006). PtdIns5P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during *Shigella flexneri* infection. *EMBO J.* 25, 1024–1034.

Perou, C.M., Leslie, J.D., Green, W., Li, L., Ward, D.M., and Kaplan, J. (1997). The Beige/Chediak-Higashi syndrome gene encodes a widely expressed cytosolic protein. *J. Biol. Chem.* 272, 29790–29794.

Pertuy, F., Eckly, A., Weber, J., Proamer, F., Rinckel, J.-Y., Lanza, F., Gachet, C., and Léon, C. (2014). Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets. *Blood* 123, 1261–1269.

Pertuy, F., Aguilar, A., Strassel, C., Eckly, A., Freund, J.-N., Duluc, I., Gachet, C., Lanza, F., and Léon, C. (2015). Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage. *J. Thromb. Haemost. JTH* 13, 115–125.

Peterson, M.R., and Emr, S.D. (2001). The class C Vps complex functions at multiple stages of the vacuolar transport pathway. *Traffic Cph. Den.* 2, 476–486.

Proikas-Cezanne, T., Takacs, Z., Dönnies, P., and Kohlbacher, O. (2015). WIP1 proteins: essential PtdIns3P effectors at the

nascent autophagosome. *J. Cell Sci.* 128, 207–217.

Projahn, D., and Koenen, R.R. (2012). Platelets: key players in vascular inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 92, 1167–1175.

R

Radley, J.M., and Haller, C.J. (1983). Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow. *Br. J. Haematol.* 53, 277–287.

Radley, J.M., Hartshorn, M.A., and Green, S.L. (1987). The response of megakaryocytes with processes to thrombin. *Thromb. Haemost.* 58, 732–736.

Radley, J.M., Rogerson, J., Ellis, S.L., and Hasthorpe, S. (1991). Megakaryocyte maturation in long-term marrow culture. *Exp. Hematol.* 19, 1075–1078.

Rameh, L.E., Talias, K.F., Duckworth, B.C., and Cantley, L.C. (1997). A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 390, 192–196.

Ramel, D., Lagarrigue, F., Pons, V., Mounier, J., Dupuis-Coronas, S., Chicanne, G., Sansonetti, P.J., Gaits-Iacovoni, F., Tronchère, H., and Payrastre, B. (2011). Shigella flexneri infection generates the lipid PI5P to alter endocytosis and prevent termination of EGFR signaling. *Sci. Signal.* 4, ra61.

Ren, Q., Barber, H.K., Crawford, G.L., Karim, Z.A., Zhao, C., Choi, W., Wang, C.-C., Hong, W., and Whiteheart, S.W. (2007). Endobrevin/VAMP-8 is the primary v-SNARE for the platelet release reaction. *Mol. Biol. Cell* 18, 24–33.

Ren, Q., Ye, S., and Whiteheart, S.W. (2008). The platelet release reaction: just when you thought platelet secretion was simple. *Curr. Opin. Hematol.* 15, 537–541.

Ren, Q., Wimmer, C., Chicka, M.C., Ye, S., Ren, Y., Hughson, F.M., and Whiteheart, S.W. (2010). Munc13-4 is a limiting factor in the pathway required for platelet granule release and hemostasis. *Blood* 116, 869–877.

Richardson, J.L., Shivdasani, R.A., Boers, C., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2005). Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* 106, 4066–4075.

Risso, G., Blaustein, M., Pozzi, B., Mammi, P., and Srebrow, A. (2015). Akt/PKB: one kinase, many modifications. *Biochem. J.* 468, 203–214.

Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Adams, R.J., Berry, J.D., Brown, T.M., Carnethon, M.R., Dai, S., de Simone, G., Ford, E.S., et al. (2011). Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 123, e18–e209.

Rohn, W.M., Rouillé, Y., Waguri, S., and Hoflack, B. (2000). Bi-directional trafficking between the trans-Golgi network and the endosomal/lysosomal system. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 12), 2093–2101.

Rosa, J.-P. (2013). The gray platelet syndrome. *Hématologie* 123–135.

Rosa, J.P., George, J.N., Bainton, D.F., Nurden, A.T., Caen, J.P., and McEver, R.P. (1987). Gray platelet syndrome. Demonstration of alpha granule membranes that can fuse with the cell surface. *J. Clin. Invest.* 80, 1138–1146.

Rudge, S.A., Anderson, D.M., and Emr, S.D. (2004). Vacuole size control: regulation of PtdIns(3,5)P₂ levels by the vacuole-associated Vac14-Fig4 complex, a PtdIns(3,5)P₂-specific phosphatase. *Mol. Biol. Cell* 15, 24–36.

Ruggeri, Z.M. (2009). Platelet adhesion under flow. *Microcirc. N. Y. N* 1994 *16*, 58–83.

Ruggeri, Z.M., Bader, R., and de Marco, L. (1982). Glanzmann thrombasthenia: deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 6038–6041.

Rusten, T.E., Rodahl, L.M.W., 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. *Mol. Biol. 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. *J. Cell Sci.* *119*, 3944–3957.

S

Sabri, S., Foudi, A., Boukour, S., Franc, B., Charrier, S., Jandrot-Perrus, M., Farndale, R.W., Jalil, A., Blundell, M.P., Cramer, E.M., et al. (2006). Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood* *108*, 134–140.

Saghazadeh, A., and Rezaei, N. (2016). Inflammation as a cause of venous thromboembolism. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*

Sagona, A.P., Nezis, I.P., Pedersen, N.M., Liestøl, K., Poulton, J., Rusten, T.E., Skotheim, R.I., Raiborg, C., and Stenmark, H. (2010). PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat. Cell Biol.* *12*, 362–371.

Sander, H.J., Slot, J.W., Bouma, B.N., Bolhuis, P.A., Pepper, D.S., and Sixma, J.J. (1983). Immunocytochemical localization of fibrinogen, platelet factor 4, and beta thromboglobulin in thin frozen sections of human blood platelets. *J. Clin. Invest.* *72*, 1277–1287.

Santoro, S.A. (1986). Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell* *46*, 913–920.

Sarkes, D., and Rameh, L.E. (2010). A novel HPLC-based approach makes possible the spatial characterization of cellular PtdIns5P and other phosphoinositides. *Biochem. J.* *428*, 375–384.

Sattler, M., Salgia, R., Durstin, M.A., Prasad, K.V., and Griffin, J.D. (1997). Thrombopoietin induces activation of the phosphatidylinositol-3' kinase pathway and formation of a complex containing p85PI3K and the protooncoprotein p120CBL. *J. Cell. Physiol.* *171*, 28–33.

de Sauvage, F.J., Hass, P.E., Spencer, S.D., Malloy, B.E., Gurney, A.L., Spencer, S.A., Darbonne, W.C., Henzel, W.J., Wong, S.C., and Kuang, W.J. (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* *369*, 533–538.

Savage, B., Saldívar, E., and Ruggeri, Z.M. (1996). Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* *84*, 289–297.

Sbrissa, D., and Shisheva, A. (2005). Acquisition of unprecedented phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate rise in hyperosmotically stressed 3T3-L1 adipocytes, mediated by ArPIKfyve-PIKfyve pathway. *J. Biol. Chem.* *280*, 7883–7889.

Sbrissa, D., Ikononov, O.C., and Shisheva, A. (1999). PIKfyve, a mammalian ortholog of yeast Fab1p lipid kinase,

synthesizes 5-phosphoinositides. Effect of insulin. *J. Biol. Chem.* 274, 21589–21597.

Sbrissa, D., Ikonomov, O.C., and Shisheva, A. (2000). PIKfyve lipid kinase is a protein kinase: downregulation of 5'-phosphoinositide product formation by autophosphorylation. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 15980–15989.

Sbrissa, D., Ikonomov, O., and Shisheva, A. (2001). Selective insulin-induced activation of class I(A) phosphoinositide 3-kinase in PIKfyve immune complexes from 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 181, 35–46.

Sbrissa, D., Ikonomov, O.C., and Shisheva, A. (2002a). Phosphatidylinositol 3-phosphate-interacting domains in PIKfyve. Binding specificity and role in PIKfyve. Endomembrane localization. *J. Biol. Chem.* 277, 6073–6079.

Sbrissa, D., Ikonomov, O.C., Deeb, R., and Shisheva, A. (2002b). Phosphatidylinositol 5-phosphate biosynthesis is linked to PIKfyve and is involved in osmotic response pathway in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 277, 47276–47284.

Sbrissa, D., Ikonomov, O.C., Strakova, J., Dondapati, R., Mlak, K., Deeb, R., Silver, R., and Shisheva, A. (2004a). A mammalian ortholog of *Saccharomyces cerevisiae* Vac14 that associates with and up-regulates PIKfyve phosphoinositide 5-kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10437–10447.

Sbrissa, D., Ikonomov, O.C., Strakova, J., and Shisheva, A. (2004b). Role for a novel signaling intermediate, phosphatidylinositol 5-phosphate, in insulin-regulated F-actin stress fiber breakdown and GLUT4 translocation. *Endocrinology* 145, 4853–4865.

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. *J. Biol. Chem.* 282, 23878–23891.

Sbrissa, D., Ikonomov, O.C., Fenner, H., and Shisheva, A. (2008). ArPIKfyve homomeric and heteromeric interactions scaffold PIKfyve and Sac3 in a complex to promote PIKfyve activity and functionality. *J. Mol. Biol.* 384, 766–779.

Sbrissa, D., Ikonomov, O.C., Filios, C., Delvecchio, K., and Shisheva, A. (2012). Functional dissociation between PIKfyve-synthesized PtdIns5P and PtdIns(3,5)P2 by means of the PIKfyve inhibitor YM201636. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 303, C436–C446.

Schink, K.O., Raiborg, C., and Stenmark, H. (2013). Phosphatidylinositol 3-phosphate, a lipid that regulates membrane dynamics, protein sorting and cell signalling. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 35, 900–912.

Schulze, H., and Shivdasani, R.A. (2004). Molecular mechanisms of megakaryocyte differentiation. *Semin. Thromb. Hemost.* 30, 389–398.

Schulze, H., Korpil, M., Hurov, J., Kim, S.-W., Zhang, J., Cantley, L.C., Graf, T., and Shivdasani, R.A. (2006). Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* 107, 3868–3875.

Schulze, M. (1865). Ein heizbarer Objectisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. *Arch Mikrosk Anat* 1–42.

Schumacher, D., Strilic, B., Sivaraj, K.K., Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2013). Platelet-derived nucleotides promote

tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. *Cancer Cell* 24, 130–137.

Schweinfurth, N., Hohmann, S., Deuschle, M., Lederbogen, F., and Schloss, P. (2010). Valproic acid and all trans retinoic acid differentially induce megakaryopoiesis and platelet-like particle formation from the megakaryoblastic cell line MEG-01. *Platelets* 21, 648–657.

Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N., Birkin, R., Dell, G., Bucci, C., Spinosa, M.R., Baltaev, R., Mack, A.F., Korniyuchuk, G., Choudhury, A., et al. (2007). Regulation of endocytic recycling of KCNQ1/KCNE1 potassium channels. *Circ. Res.* 100, 686–692.

Seizer, P., Gawaz, M., and May, A.E. (2008). Platelet-monocyte interactions--a dangerous liaison linking thrombosis, inflammation and atherosclerosis. *Curr. Med. Chem.* 15, 1976–1980.

Semple, J.W., Italiano, J.E., and Freedman, J. (2011). Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 264–274.

Senderek, J., Bergmann, C., Weber, S., Ketelsen, U.-P., Schorle, H., Rudnik-Schöneborn, S., Büttner, 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. *Hum. Mol. Genet.* 12, 349–356.

Setty, S.R.G., Tenza, D., Truschel, S.T., Chou, E., Sviderskaya, E.V., Theos, A.C., Lamoreux, M.L., Di Pietro, S.M., Starcevic, M., Bennett, D.C., et al. (2007). BLOC-1 is required for cargo-specific sorting from vacuolar early endosomes toward lysosome-related organelles. *Mol. Biol. Cell* 18, 768–780.

Shelton, G.D., Rider, B.E., Child, G., Tzannes, S., Guo, L.T., Moghadaszadeh,

B., Troiano, E.C., Haase, B., Wade, C.M., and Beggs, A.H. (2015). X-linked myotubular myopathy in Rottweiler dogs is caused by a missense mutation in Exon 11 of the MTM1 gene. *Skelet. Muscle* 5, 1.

Shen, J., Yu, W.-M., Brotto, M., Scherman, J.A., Guo, C., Stoddard, C., Nosek, T.M., Valdivia, H.H., and Qu, C.-K. (2009). Deficiency of MIP/MTMR14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca(2+) homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 11, 769–776.

Shionoya, T. (1927). STUDIES IN EXPERIMENTAL EXTRACORPOREAL THROMBOSIS: II. THROMBUS FORMATION IN NORMAL BLOOD IN THE EXTRACORPOREAL VASCULAR LOOP. *J. Exp. Med.* 46, 13–17.

Shirakawa, R., Higashi, T., Tabuchi, A., Yoshioka, A., Nishioka, H., Fukuda, M., Kita, T., and Horiuchi, H. (2004). Munc13-4 is a GTP-Rab27-binding protein regulating dense core granule secretion in platelets. *J. Biol. Chem.* 279, 10730–10737.

Shisheva, A. (2008). PIKfyve: Partners, significance, debates and paradoxes. *Cell Biol. Int.* 32, 591–604.

Shisheva, A. (2013). PtdIns5P: news and views of its appearance, disappearance and deeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 538, 171–180.

Shisheva, A., Sbrissa, D., and Ikononov, O. (1999). Cloning, characterization, and expression of a novel Zn²⁺-binding FYVE finger-containing phosphoinositide kinase in insulin-sensitive cells. *Mol. Cell. Biol.* 19, 623–634.

Shisheva, A., Rusin, B., Ikononov, O.C., DeMarco, C., and Sbrissa, D. (2001). Localization and insulin-regulated relocation of phosphoinositide 5-kinase PIKfyve in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 11859–11869.

- Shisheva, A., Sbrissa, D., and Ikonov, O.** (2015). Plentiful PtdIns5P from scanty PtdIns(3,5)P2 or from ample PtdIns? PIKfyve-dependent models: Evidence and speculation (response to: DOI 10.1002/bies.201300012). *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *37*, 267–277.
- Shojaiefard, M., Strutz-Seebohm, N., Tavaré, J.M., Seebohm, G., and Lang, F.** (2007). Regulation of the Na⁽⁺⁾, glucose cotransporter by PIKfyve and the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *359*, 843–847.
- Siddhanta, U., McIlroy, J., Shah, A., Zhang, Y., and Backer, J.M.** (1998). Distinct roles for the p110alpha and hVPS34 phosphatidylinositol 3'-kinases in vesicular trafficking, regulation of the actin cytoskeleton, and mitogenesis. *J. Cell Biol.* *143*, 1647–1659.
- Siddiqui, T.I., Kumar K S, A., and Dikshit, D.K.** (2013). Platelets and atherothrombosis: causes, targets and treatments for thrombosis. *Curr. Med. Chem.* *20*, 2779–2797.
- Silswal, N., Parelkar, N.K., Wacker, M.J., Brotto, M., and Andresen, J.** (2011). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate increases intracellular free Ca²⁺ in arterial smooth muscle cells and elicits vasoconstriction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *300*, H2016–H2026.
- Simons, M., and Trotter, J.** (2007). Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 533–540.
- 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.
- Slupsky, J.R., Kalbas, M., Willuweit, A., Henn, V., Kroczeck, R.A., and Müller-Berghaus, G.** (1998). Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb. Haemost.* *80*, 1008–1014.
- Socolovsky, M., Fallon, A.E., Wang, S., Brugnara, C., and Lodish, H.F.** (1999). Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* *98*, 181–191.
- Sohma, Y., Akahori, H., Seki, N., Hori, T., Ogami, K., Kato, T., Shimada, Y., Kawamura, K., and Miyazaki, H.** (1994). Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett.* *353*, 57–61.
- Solar, G.P., Kerr, W.G., Zeigler, F.C., Hess, D., Donahue, C., de Sauvage, F.J., and Eaton, D.L.** (1998). Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood* *92*, 4–10.
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E.** (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* *362*, 318–324.
- Sopjani, M., Kunert, A., Czarkowski, K., Klaus, F., Laufer, J., Föllner, M., and Lang, F.** (2010). Regulation of the Ca⁽²⁺⁾ channel TRPV6 by the kinases SGK1, PKB/Akt, and PIKfyve. *J. Membr. Biol.* *233*, 35–41.
- Sreeramkumar, V., Adrover, J.M., Ballesteros, I., Cuartero, M.I., Rossaint, J., Bilbao, I., Náchter, M., Pitaval, C., Radovanovic, I., Fukui, Y., et al.** (2014). Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* *346*, 1234–1238.
- zur Stadt, U., Schmidt, S., Kasper, B., Beutel, K., Diler, A.S., Henter, J.-I., Kabisch, H., Schneppenheim, R., Nürnberg, P., Janka, G., et al.** (2005).

Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 827–834.

zur Stadt, U., Rohr, J., Seifert, W., Koch, F., Grieve, S., Pagel, J., Strauss, J., Kasper, B., Nürnberg, G., Becker, C., et al. (2009). Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) is caused by mutations in Munc18-2 and impaired binding to syntaxin 11. *Am. J. Hum. Genet.* *85*, 482–492.

Starck, J., Cohet, N., Gonnet, C., Sarrazin, S., Doubeikovskaia, Z., Doubeikovski, A., Verger, A., Duterque-Coquillaud, M., and Morle, F. (2003). Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLF. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 1390–1402.

Stijf-Bultsma, Y., Sommer, L., Tauber, M., Baalbaki, M., Giardoglou, P., Jones, D.R., Gelato, K.A., van Pelt, J., Shah, Z., Rahnamoun, H., et al. (2015). The basal transcription complex component TAF3 transduces changes in nuclear phosphoinositides into transcriptional output. *Mol. Cell* *58*, 453–467.

Strassel, C., Eckly, A., Léon, C., Moog, S., Cazenave, J.-P., Gachet, C., and Lanza, F. (2012). Hirudin and heparin enable efficient megakaryocyte differentiation of mouse bone marrow progenitors. *Exp. Cell Res.* *318*, 25–32.

Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., and Brech, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic Cph. Den.* *10*, 925–937.

Suzuki, T., Oiso, N., Gautam, R., Novak, E.K., Panthier, J.-J., Suprabha, P.G., Vida, T., Swank, R.T., and Spritz, R.A. (2003). The mouse organellar biogenesis mutant buff results from a mutation in Vps33a, a homologue of yeast vps33 and

Drosophila carnation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 1146–1150.

T

Tablin, F., Castro, M., and Leven, R.M. (1990). Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J. Cell Sci.* *97* (*Pt 1*), 59–70.

Taha, D., Khider, A., Cullinane, A.R., and Gissen, P. (2007). A novel VPS33B mutation in an ARC syndrome patient presenting with osteopenia and fractures at birth. *Am. J. Med. Genet. A.* *143A*, 2835–2837.

Takeuchi, K., Ogura, M., Saito, H., Satoh, M., and Takeuchi, M. (1991). Production of platelet-like particles by a human megakaryoblastic leukemia cell line (MEG-01). *Exp. Cell Res.* *193*, 223–226.

Takeuchi, K., Satoh, M., Kuno, H., Yoshida, T., Kondo, H., and Takeuchi, M. (1998). Platelet-like particle formation in the human megakaryoblastic leukaemia cell lines, MEG-01 and MEG-01s. *Br. J. Haematol.* *100*, 436–444.

Tawk, L., Chicanne, G., Dubremetz, J.-F., Richard, V., Payrastre, B., Vial, H.J., Roy, C., and Wengelnik, K. (2010). Phosphatidylinositol 3-phosphate, an essential lipid in Plasmodium, localizes to the food vacuole membrane and the apicoplast. *Eukaryot. Cell* *9*, 1519–1530.

Thon, J.N., and Italiano, J.E. (2012). Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb. Exp. Pharmacol.* 3–22.

Thon, J.N., Montalvo, A., Patel-Hett, S., Devine, M.T., Richardson, J.L., Ehrlicher, A., Larson, M.K., Hoffmeister, K., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2010). Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J. Cell Biol.* *191*, 861–874.

- Thon, J.N., Devine, M.T., Jurak Begonja, A., Tibbitts, J., and Italiano, J.E.** (2012a). High-content live-cell imaging assay used to establish mechanism of trastuzumab emtansine (T-DM1)--mediated inhibition of platelet production. *Blood* *120*, 1975–1984.
- Thon, J.N., Macleod, H., Begonja, A.J., Zhu, J., Lee, K.-C., Mogilner, A., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E.** (2012b). Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nat. Commun.* *3*, 852.
- Thumm, M., Busse, R.A., Scacioc, A., Stephan, M., Janshoff, A., Kühnel, K., and Krick, R.** (2013). It takes two to tango: PROPPINs use two phosphoinositide-binding sites. *Autophagy* *9*, 106–107.
- Tomer, A., Harker, L.A., and Burstein, S.A.** (1987). Purification of human megakaryocytes by fluorescence-activated cell sorting. *Blood* *70*, 1735–1742.
- Tomer, A., Harker, L.A., and Burstein, S.A.** (1988). Flow cytometric analysis of normal human megakaryocytes. *Blood* *71*, 1244–1252.
- Tong, W., Sulahian, R., Gross, A.W., Hendon, N., Lodish, H.F., and Huang, L.J.** (2006). The membrane-proximal region of the thrombopoietin receptor confers its high surface expression by JAK2-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* *281*, 38930–38940.
- Tosch, V., Rohde, H.M., Tronchère, H., Zanuteli, E., Monroy, N., Kretz, C., Dondaine, N., Payrastre, B., Mandel, J.-L., and Laporte, J.** (2006). A novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P₂ phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 3098–3106.
- Totani, L., and Evangelista, V.** (2010). Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 2357–2361.
- Touchberry, C.D., Bales, I.K., Stone, J.K., Rohrberg, T.J., Parelkar, N.K., Nguyen, T., Fuentes, O., Liu, X., Qu, C.-K., Andresen, J.J., et al.** (2010). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P₂) potentiates cardiac contractility via activation of the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* *285*, 40312–40321.
- Traer, C.J., Rutherford, A.C., Palmer, K.J., Wassmer, T., Oakley, J., Attar, N., Carlton, J.G., Kremerskothen, J., Stephens, D.J., and Cullen, P.J.** (2007). SNX4 coordinates endosomal sorting of TfnR with dynein-mediated transport into the endocytic recycling compartment. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1370–1380.
- Tronchère, 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. *J. Biol. Chem.* *279*, 7304–7312.
- Tsien, R.W., Ellinor, P.T., and Horne, W.A.** (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol. Sci.* *12*, 349–354.
- Tsuruta, F., Green, E.M., Rousset, M., and Dolmetsch, R.E.** (2009). PIKfyve regulates CaV1.2 degradation and prevents excitotoxic cell death. *J. Cell Biol.* *187*, 279–294.

U

- Ungewickell, A., Hugge, C., Kisseleva, M., Chang, S.-C., Zou, J., Feng, Y., Galyov, E.E., Wilson, M., and Majerus, P.W.** (2005). The identification and characterization of two phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18854–18859.

Urban, D., Li, L., Christensen, H., Pluthero, F.G., Chen, S.Z., Puhacz, M., Garg, P.M., Lanka, K.K., Cummings, J.J., Kramer, H., et al. (2012). The VPS33B-binding protein VPS16B is required in megakaryocyte and platelet α -granule biogenesis. *Blood* 120, 5032–5040.

Urbich, C., Dernbach, E., Aicher, A., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2002). CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 106, 981–986.

V

Vale, R.D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112, 467–480.

Valet, C., Chicanne, G., Severac, C., Chaussade, C., Whitehead, M.A., Cabou, C., Gratacap, M.-P., Gaits-Iacovoni, F., Vanhaesebroeck, B., Payrastra, B., et al. (2015). Essential role of class II PI3K-C2 α in platelet membrane morphology. *Blood* 126, 1128–1137.

Vergne, I., and Deretic, V. (2010). The role of PI3P phosphatases in the regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 584, 1313–1318.

Viaud, J., Boal, F., Tronchère, H., Gaits-Iacovoni, F., and Payrastra, B. (2014a). Phosphatidylinositol 5-phosphate: a nuclear stress lipid and a tuner of membranes and cytoskeleton dynamics. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 36, 260–272.

Viaud, J., Lagarrigue, F., Ramel, D., Allart, S., Chicanne, G., Ceccato, L., Courilleau, D., Xuereb, J.-M., Pertz, O., Payrastra, B., et al. (2014b). Phosphatidylinositol 5-phosphate regulates invasion through binding and activation of Tiam1. *Nat. Commun.* 5, 4080.

W

Wada, Y., Lu, R., Zhou, D., Chu, J., Przewlaka, T., Zhang, S., Li, L., Wu, Y., Qin, J., Balasubramanyam, V., et al. (2007). Selective abrogation of Th1 response by STA-5326, a potent IL-12/IL-23 inhibitor. *Blood* 109, 1156–1164.

Wada, Y., Cardinale, I., Khatcherian, A., Chu, J., Kantor, A.B., Gottlieb, A.B., Tatsuta, N., Jacobson, E., Barsoum, J., and Krueger, J.G. (2012). Apilimod inhibits the production of IL-12 and IL-23 and reduces dendritic cell infiltration in psoriasis. *PloS One* 7, e35069.

Walker, D.M., Urbé, S., Dove, S.K., Tenza, D., Raposo, G., and Clague, M.J. (2001). Characterization of MTMR3, an inositol lipid 3-phosphatase with novel substrate specificity. *Curr. Biol. CB* 11, 1600–1605.

Wang, N., Wu, W.-I., and De Lozanne, A. (2002). BEACH family of proteins: phylogenetic and functional analysis of six Dictyostelium BEACH proteins. *J. Cell. Biochem.* 86, 561–570.

Weber, C. (2005). Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ. Res.* 96, 612–616.

Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., and Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759–772.

Wei, M.L. (2006). Hermansky-Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* 19, 19–42.

Weiss, H.J., Witte, L.D., Kaplan, K.L., Lages, B.A., Chernoff, A., Nossel, H.L., Goodman, D.S., and Baumgartner, H.R. (1979). Heterogeneity in storage pool deficiency: studies on granule-bound

substances in 18 patients including variants deficient in alpha-granules, platelet factor 4, beta-thromboglobulin, and platelet-derived growth factor. *Blood* 54, 1296–1319.

Wencel-Drake, J.D., Painter, R.G., Zimmerman, T.S., and Ginsberg, M.H. (1985). Ultrastructural localization of human platelet thrombospondin, fibrinogen, fibronectin, and von Willebrand factor in frozen thin section. *Blood* 65, 929–938.

Wendling, F., Maraskovsky, E., Debili, N., Florindo, C., Teepe, M., Titeux, M., Methia, N., Breton-Gorius, J., Cosman, D., and Vainchenker, W. (1994). cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* 369, 571–574.

White, J.G. (1978). Platelet microtubules and giant granules in the Chediak-Higashi syndrome. *Am. J. Med. Technol.* 44, 273–278.

Whiteford, C.C., Brearley, C.A., and Ulug, E.T. (1997). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate defines a novel PI 3-kinase pathway in resting mouse fibroblasts. *Biochem. J.* 323 (Pt 3), 597–601.

Wisler, J.W., and Becker, R.C. (2014). Emerging paradigms in arterial thrombosis. *J. Thromb. Thrombolysis* 37, 4–11.

Wolberg, A.S., Aleman, M.M., Leiderman, K., and Machlus, K.R. (2012). Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth. Analg.* 114, 275–285.

Y

Yamada, E. (1957). The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat. (Basel)* 29, 267–290.

Yamada, M., Komatsu, N., Okada, K., Kato, T., Miyazaki, H., and Miura, Y. (1995). Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in a human

thrombopoietin-dependent cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 230–237.

Ye, S., Karim, Z.A., Al Hawas, R., Pessin, J.E., Filipovich, A.H., and Whiteheart, S.W. (2012). Syntaxin-11, but not syntaxin-2 or syntaxin-4, is required for platelet secretion. *Blood* 120, 2484–2492.

Youssefian, T., and Cramer, E.M. (2000). Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood* 95, 4004–4007.

Z

Zago, A.C., Simon, D.I., Wang, Y., Sakuma, M., Chen, Z., Croce, K., Ustinov, V., Shi, C., and Martinez Filho, E.E. (2008). The importance of the interaction between leukocyte integrin Mac-1 and platelet glycoprotein Ib-a for leukocyte recruitment by platelets and for the inflammatory response to vascular injury. *Arq. Bras. Cardiol.* 90, 54–63.

Zauli, G., and Catani, L. (1995). Human megakaryocyte biology and pathophysiology. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 21, 135–157.

Zhang, J., Banfić, H., Straforini, F., Tosi, L., Volinia, S., and Rittenhouse, S.E. (1998). A type II phosphoinositide 3-kinase is stimulated via activated integrin in platelets. A source of phosphatidylinositol 3-phosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 14081–14084.

Zhang, Q., Zhao, B., Li, W., Oiso, N., Novak, E.K., Rusiniak, M.E., Gautam, R., Chintala, S., O'Brien, E.P., Zhang, Y., et al. (2003). Ru2 and Ru encode mouse orthologs of the genes mutated in human Hermansky-Pudlak syndrome types 5 and 6. *Nat. Genet.* 33, 145–153.

Zhang, X., Chow, C.Y., Sahenk, Z., Shy, M.E., Meisler, M.H., and Li, J. (2008). Mutation of FIG4 causes a rapidly

progressive, asymmetric neuronal degeneration. *Brain J. Neurol.* *131*, 1990–2001.

Zhang, Y., Wang, Z., and Ravid, K. (1996). The cell cycle in polyploid megakaryocytes is associated with reduced activity of cyclin B1-dependent cdc2 kinase. *J. Biol. Chem.* *271*, 4266–4272.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 17518–17523.

Zimmet, J., and Ravid, K. (2000). Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp. Hematol.* *28*, 3–16.

Zolov, S.N., Bridges, D., Zhang, Y., Lee, W.-W., Riehle, E., Verma, R., Lenk, G.M., Converso-Baran, K., Weide, T., Albin, R.L., et al. (2012). In vivo, Pikfyve generates PI(3,5)P₂, which serves as both a signaling lipid and the major precursor for PI5P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 17472–17477.

Zucker-Franklin, D. (1981). Endocytosis by human platelets: metabolic and freeze-fracture studies. *J. Cell Biol.* *91*, 706–715.

Annexe

Phosphoinositides: Important lipids in the coordination of cell dynamics

Viaud J, Mansour R, Antkowiak A, Mujalli A, Valet C, Chicanne G, Xuereb JM, Terrisse AD, Séverin S, Gratacap MP, Gaits-Iacovoni F, Payrastre B

Article dans Biochimie. 2016 Jun;125:250-8. doi: 10.1016/j.biochi.2015.09.005

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Review

Phosphoinositides: Important lipids in the coordination of cell dynamics

Julien Viaud ^{a,*}, Rana Mansour ^a, Adrien Antkowiak ^a, Abdulrahman Mujalli ^a,
Colin Valet ^a, Gaëtan Chicanne ^a, Jean-Marie Xuereb ^a, Anne-Dominique Terrisse ^a,
Sonia Séverin ^a, Marie-Pierre Gratacap ^a, Frédérique Gaits-Iacovoni ^a,
Bernard Payrastre ^{a,b,*}

^a INSERM UMR 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Université Toulouse III Paul Sabatier, 1 Avenue Jean Poulhès, BP84225, 31432 Toulouse Cedex 04, France

^b Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Laboratoire d'Hématologie, 31059 Toulouse Cedex 03, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 July 2015

Accepted 2 September 2015

Available online xxx

Keywords:

Phosphoinositides

Cell signaling

Lipids

Pathologies

Phosphoinositide-metabolizing enzymes

PI3K

ABSTRACT

By interacting specifically with proteins, phosphoinositides organize the spatiotemporal formation of protein complexes involved in the control of intracellular signaling, vesicular trafficking and cytoskeleton dynamics. A set of specific kinases and phosphatases ensures the production, degradation and inter-conversion of phosphoinositides to achieve a high level of precision in the regulation of cellular dynamics coordinated by these lipids. The direct involvement of these enzymes in cancer, genetic or infectious diseases, and the recent arrival of inhibitors targeting specific phosphoinositide kinases in clinic, emphasize the importance of these lipids and their metabolism in the biomedical field.

© 2015 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

Contents

1. Introduction	00
2. Phosphoinositides: different roles for different species	00
2.1. PtdIns3P [3]	00
2.2. PtdIns4P [4]	00
2.3. PtdIns5P [26]	00
2.4. PtdIns(3,4)P ₂ [38]	00
2.5. PtdIns(3,5)P ₂ [45]	00
2.6. PtdIns(4,5)P ₂ [1]	00
2.7. PtdIns(3,4,5)P ₃ [2]	00
3. How to quantify and localize phosphoinositides?	00
3.1. Quantification	00
3.1.1. [³² Pi] or [³ H]-myo-inositol metabolic labeling	00
3.1.2. Mass assay	00
3.1.3. Mass spectrometry	00
3.2. Localization	00
4. Phosphoinositide-metabolizing enzymes and pathologies	00
5. Targeting PI3K in cancer and thrombosis	00
5.1. Class I PI3K and cancer	00

* Corresponding authors. INSERM UMR 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Université Toulouse III Paul Sabatier, 1 Avenue Jean Poulhès, BP84225, 31432 Toulouse Cedex 04, France.

E-mail addresses: julien.viaud@inserm.fr (J. Viaud), bernard.payrastre@inserm.fr (B. Payrastre).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.005>

0300-9084/© 2015 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

5.1.1. PI3K α 00
 5.1.2. PI3K δ 00
 5.2. PI3K β and arterial thrombosis 00
 6. Conclusion 00
 Competing interests 00
 Acknowledgment 00
 References 00

1. Introduction

Phosphoinositides (PIs), also called inositol lipids, are glycerophospholipids that account for about 10–15% of membrane phospholipids. They are composed of two fatty acids,

predominantly stearic acid (C18:0) in position 1 and arachidonic acid (C20:4) in position 2, but other minor molecular species coexist in most cells. These fatty acids are attached to a glycerol backbone, which is connected to an inositol ring by a phosphodiester bond (Fig. 1, top left). Despite the presence of five free

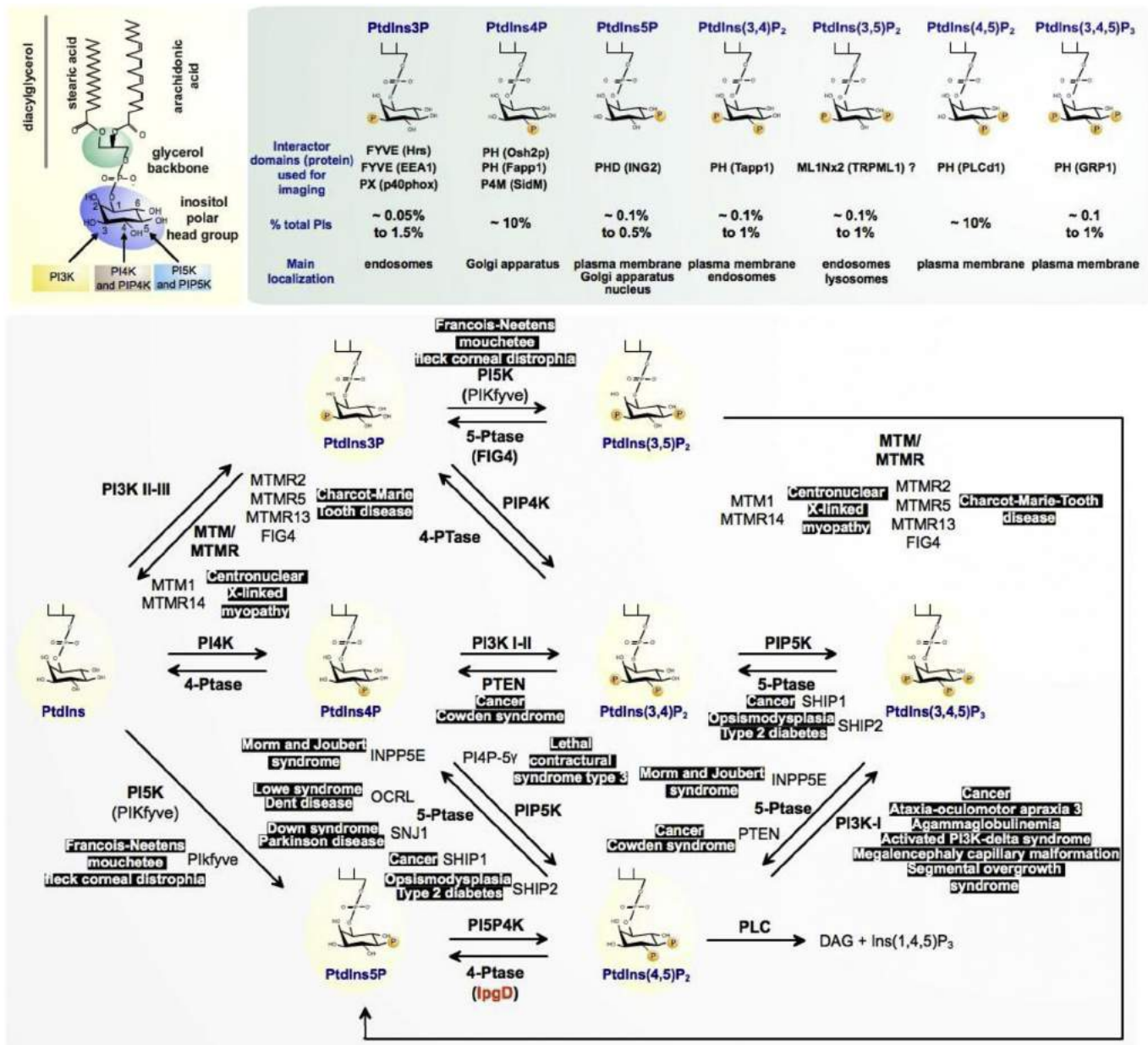


Fig. 1. Phosphoinositides: structure, localization, metabolism and pathophysiology.

hydroxyl groups in the inositol ring, only the positions 3, 4 and 5 are phosphorylated by specific kinases. Steric hindrance likely prevents access to positions 1 and 6 by the kinases. Thus, in addition to phosphatidylinositol (PtdIns) representing 80% of the total level of PIs, 7 other PIs were identified, corresponding to the various combinations of phosphorylation of the inositol ring (Fig. 1, top right). PtdIns4P and PtdIns(4,5)P₂ represent ~10% of total PIs while the remaining species do not represent more than 1%–2% (Fig. 1, top right). PIs are characterized by an highly active metabolism involving a set of tightly regulated specific kinases and phosphatases (Fig. 1, bottom), a reflection of their role as second messengers. These lipids can directly interact with protein domains including PH (Pleckstrin Homology), FYVE (Fab-1, YGL023, Vps27 and EEA1), PX (phox) or ENTH (Epsin N-Terminal Homology) domains. Following various stimuli (hormones, growth factors, adhesion molecules, chemoattractants, stresses, etc ...), PI-kinases and -phosphatases are relocalized, activated or inhibited to allow the spatio-temporal formation of membrane territories with specific PIs content. PIs can then coordinate the recruitment of specific signaling proteins to control cellular events. The use of PI-interacting domains to locate these lipids by imaging has generated much interest in recent years. Using these approaches, it has been shown that PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4)P₂ and PtdIns(3,4,5)P₃ are predominantly localized at the plasma membrane [1,2] while PtdIns3P is preferentially found on early endosomes [3] and PtdIns4P is present both at the plasma membrane and at the Golgi apparatus [4]. In some cells, the distribution of PIs is essential to maintain cell polarity [5]. In this review we will discuss the role of the different PIs and the implication of PI-metabolic enzymes in pathologies such as cancer and arterial thrombosis. We will emphasize on the role of class I PI3-kinases (PI3K) and their recent therapeutic use in the treatment of cancer.

2. Phosphoinositides: different roles for different species

2.1. PtdIns3P [3]

This lipid is present in small amounts in eukaryotic cells and is mainly generated from PtdIns by class II and class III PI3Ks (protein domains are shown in Fig. 2). It is also produced by dephosphorylation of PtdIns(3,4)P₂ by a type Iα 4-phosphatase, and of PtdIns(3,5)P₂ by a 5-phosphatase called Fig4 (or Sac3). Class II PI3Ks [6,7] and type Iα 4-phosphatase [8] may generate a pool of PtdIns3P at the plasma membrane while the class III PI3K (also called Vps34) and Fig4 could be responsible for the control of the endosomal pool [9]. It is noteworthy that class III PI3K also plays a major role in autophagy by producing PtdIns3P in autophagosomes [10]. Except in cells infected by the pathogen *Plasmodium falciparum*, which exhibit an important increase in PtdIns3P levels [11], literature does not report example of major modifications of PtdIns3P levels. However, a number of cellular stimuli can induce modest increases in the amount of PtdIns3P. This the case in platelets following thrombin or collagen-related peptide (CRP) situation [7,12]. However, the maintenance of a basal, house-keeping, pool of PtdIns3P appears to be essential for cellular homeostasis, particularly in the control of intracellular trafficking and membrane dynamics and structuration [6,7]. PtdIns3P recruits protein effectors through FYVE or PX domains (FYVE domains are widely used to locate this lipid by imaging) and, according to its location, regulates: i) intracellular trafficking (endosomal fusion, vesicle recycling to the plasma membrane and to the trans-Golgi, vesicular sorting to lysosomal compartments) [3]; ii) autophagosome maturation by recruiting proteins from the Atg-18 family (WIPI1 and 2) [13]; iii) exocytosis of insulin granules by an unknown mechanism [14]; iv) activation of p40phox, a component of

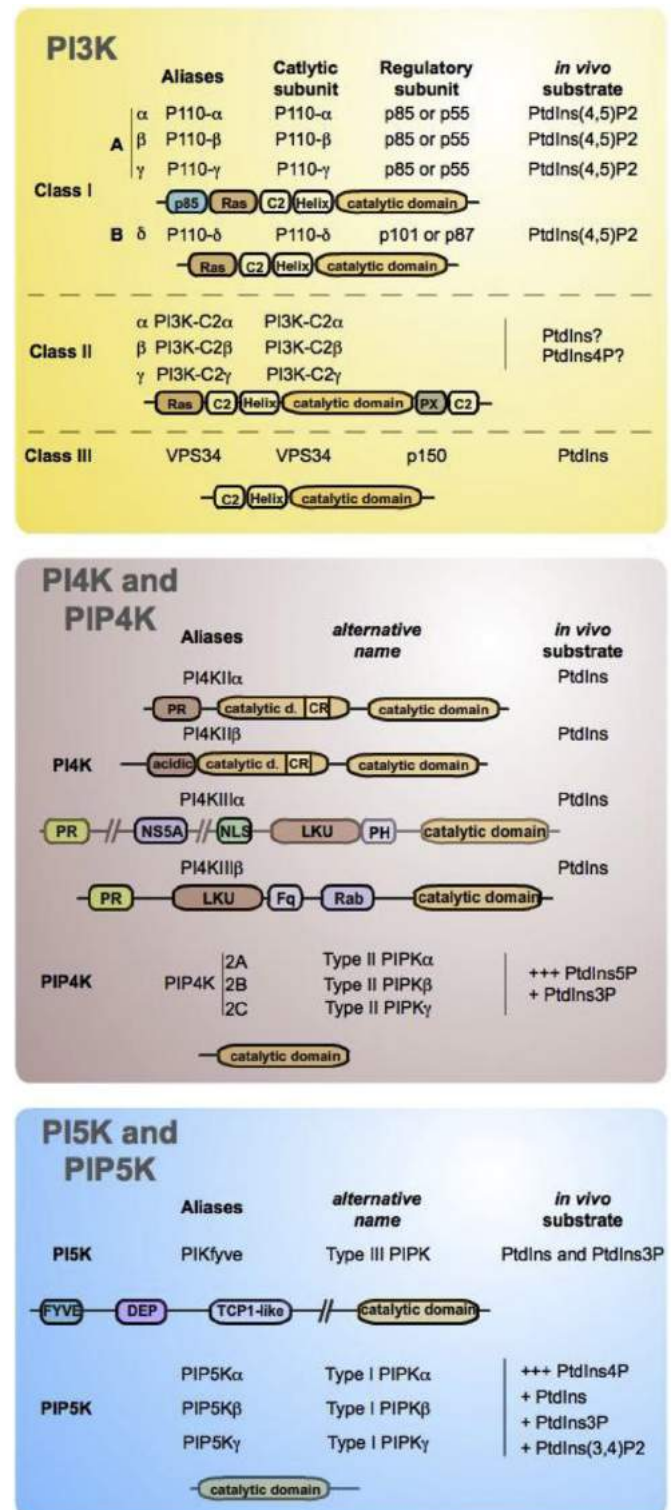


Fig. 2. Protein domain organization and *in vivo* substrates of phosphoinositide kinases.

the NADPH oxidase [15]; v) cytokinesis as it recruits the protein FYVE-HUNDRED to cytokinetic bridges [16]. PtdIns3P is also an important intermediate in the biosynthesis of PtdIns(3,5)P₂ through phosphorylation by the 5-kinase PIKfyve. Thus, PtdIns3P has many roles but its involvement in the regulation of intracellular trafficking (endosomal pathway and autophagy) is the best characterized.

2.2. PtdIns4P [4]

This is one of the most abundant PI. It is mainly present at the Golgi apparatus and at the plasma membrane, but it is also found in endosomal compartments and in the trans-Golgi. Its production is ensured in mammals by two class II PI4K (PI4KII α and β) and two class III PI4K (PI4KIII α and β) (protein domains are shown in Fig. 2). PI4KII α is predominantly found in the endosomal system, the trans-Golgi and the plasma membrane [17] while PI4KII β is mainly present at the plasma membrane [18]. The regulation of these kinases is still unclear. PI4KIII α is present at the plasma membrane, at the endoplasmic reticulum (ER) and at the Golgi apparatus. PI4KIII β is described as the enzyme responsible for the synthesis of PtdIns4P at the Golgi apparatus following its interaction with the small G protein Arf1 and the NCS-1 (neuronal calcium sensor-1) protein [19]. It is activated by phosphorylation and maintained active by interactions with 14-3-3 proteins that prevent its dephosphorylation [20]. Another enzyme involved in the metabolism of PtdIns4P is the 4-phosphatase Sac1 which is localized at the ER and at the plasma membrane. Following nutrient deprivation, Sac1 relocates at the Golgi apparatus to decrease the local pool of PtdIns4P [21]. Recently, it has been shown that proteins from the OSBP family are able to transfer the PtdIns4P from the trans-Golgi or the plasma membrane to the RE in a cholesterol-dependent way [22]. PtdIns4P regulates vesicular transport from the Golgi apparatus to the plasma membrane and the endosomal compartments. Thus, this lipid ensures several functions including: i) location of enzymes resident in the Golgi apparatus; ii) vesicle formation by inducing membrane deformations [23]; iii) sorting of proteins to endosomes (by interacting with the clathrin adapter protein, GGA2, which in turn interacts with Arf1 for an efficient recruitment) [24] and iv) proteins transport from the trans-Golgi to the plasma membrane (which involves the recruitment and activation of Sec2, an exchange factor of Rab proteins) [25]. In addition, PtdIns4P is a key intermediate in the biosynthesis of PtdIns(4,5)P₂ at the plasma membrane.

2.3. PtdIns5P [26]

This is the last identified PI, which is present in low amounts in quiescent cells. This lipid can be synthesized by phosphorylation of PtdIns by the 5-kinase PIKfyve but also by dephosphorylation of PtdIns(3,5)P₂ by 3-phosphatases of the myotubularins family. Although it has never been clearly demonstrated, it can also be generated by mammalian type II 4-phosphatases acting on PtdIns(4,5)P₂. Conversely, it has been shown that PtdIns5P is specifically phosphorylated by PIP4K A, B and C (also called type II PIPK α , β and γ) to produce PtdIns(4,5)P₂ (protein domains are shown in Fig. 2). The level of PtdIns5P increases following specific stimuli (thrombin, insulin, FGF-1, some oncogenes, osmotic stress, H₂O₂, UV, bacterial infection) [26]. It is located at the plasma membrane and in intracellular compartments (including endosomes, ER and Golgi apparatus) [27]. The functions associated to PtdIns5P increase are different regarding the location of this lipid. The best characterized correspond to nuclear PtdIns5p which has been described as a stress-response element. In the nucleus, PtdIns5P modulates gene expression by interacting with proteins involved in chromatin remodeling. PtdIns5P interacts especially with the PHD domain of ING2, which is commonly used as a probe to image this lipid [28]. Our team pioneered a body of work, starting from 2002, that demonstrated that the virulence factor of *Shigella flexneri*, IpgD (Invasion plasmid gene D), is a powerful PtdIns(4,5)P₂ 4-phosphatase producing significant amounts of PtdIns5P in the host cell upon infection. Subsequently, PtdIns5P generated at the entry sites of the bacteria, modulates membrane dynamics and

intracellular signals of the host cell [29]. It induces clustering, ligand-free activation and stabilization of the EGF receptor by impairing lysosomal trafficking, thereby activating survival signaling of the host cell for the benefit of bacteria [30,31]. Interestingly, this blockade of EGFR degradation seems to involve TOM1 [32]. Moreover, this increase in PtdIns5P at the plasma membrane leads to the closure of connexin hemichannels, which normally release ATP in the extracellular medium to activate the inflammatory reaction against the pathogen [33]. Thus, the bacterial pathogen uses PtdIns5P to hijack host cell molecular machinery and responses for its benefit. Besides this pathological situation, the role of PtdIns5P in physiology remains largely unknown. It has been shown that the engagement of the T receptor (TCR) in T cells induces an increase in PtdIns5P, which in turns recruits DOK (Downstream of Tyrosine Kinases) family proteins to promote their phosphorylation and to activate a negative feedback loop [34]. Stimulation of adipocytes with insulin also induces a peak production of PtdIns5P resulting in the loss of actin stress fibers and the acceleration of the translocation of the glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane [35]. Recently, we have shown that PtdIns5P was coordinating membrane dynamics and actin cytoskeleton reorganization. Indeed, an increase in PtdIns5P levels resulting from either ectopic expression of the bacterial phosphatase IpgD, stimulation of cells with FGF-1 or expression of the NPM-ALK oncogene, leads to the recruitment and the activation of the guanine nucleotide factor exchange (GEF) Tiam1 by direct interaction of the lipid with its C-terminal PH domain. This interaction leads to Rac1 activation and induces a strong membrane dynamics associated with the loss of actin fibers promoting cell motility and invasion [36]. Recruitment and local activation of the Tiam1/Rac1 module happens to be restricted to endosomes and dorsal ruffles, and to regulate recycling of receptors and secretion of metalloproteinases involved in PtdIns5P-dependent invasion. Recent work demonstrated that PtdIns5P regulates autophagy independently of the canonical pathway involving Vps34 and PtdIns3P, strongly suggesting that non-nuclear PtdIns5P could be a central regulator of vesicular trafficking with different outcomes depending on the way of production [37].

2.4. PtdIns(3,4)P₂ [38]

This PI is produced at the plasma membrane upon cell stimulation by dephosphorylation of PtdIns(3,4,5)P₃ by the 5 phosphatase SHIP1, SHIP2 and SKIP whose expression varies according to tissues. Class II PI3Ks have been reported to produce a pool of PtdIns(3,4)P₂ that controls clathrin-dependent endocytosis from PtdIns4P [39] (protein domains are shown in Fig. 2). Specific functions of PtdIns(3,4)P₂ are still poorly understood and only few effectors have been identified [40]. However, some publications ascribe important functions to this lipid in diverse cellular processes in addition to its role in endocytosis. Those include: i) downregulation of insulin signaling by direct interaction with the PH domain of TAPP1 and 2 [41]; ii) ligand-dependent G protein-coupled receptors endocytosis through a process involving SHIP1, SHIP2, the recruitment of Lamellipodin via its PH domain, and the subsequent recruitment of Endophilin to mediate endocytosis [42]; iii) formation of lamellipodia, possibly through its interaction with Lamellipodin [43]; and iv) formation of podosomes [44].

2.5. PtdIns(3,5)P₂ [45]

This scarce PI is synthesized mainly through phosphorylation of PtdIns3P by the 5-kinase PIKfyve (protein domains are shown in Fig. 2). PIKfyve operates within a protein complex called PAS (for PIKfyve/ArPIKfyve/Sac3). PAS has the capacity to reversibly produce

PtdIns(3,5)P₂ because of the presence of the 5-phosphatase Sac3 (or Fig4 in mammals), which hydrolyses PtdIns(3,5)P₂ into PtdIns3P [45]. This kinase/phosphatase complex is localized to endosomes, due to the interaction of the FYVE domain of PIKfyve with PtdIns3P [46]. Another important route of PtdIns(3,5)P₂ metabolism implicates the 3-phosphatases of the myotubularins family, which produce PtdIns5P by dephosphorylating PtdIns(3,5)P₂ [47]. RNA silencing and/or inhibition of the enzymes of the PAS complex has shown that these enzymes and PtdIns(3,5)P₂ is involved in homeostasis of endosomal trafficking. PtdIns(3,5)P₂ may regulate endosomal fission and fusion, the retrograde transport of endosomes to the trans-Golgi and vesicle sorting to the late endosome [48–50]. These effects are mediated through effectors having for the majority a β -propeller domain capable to bind this lipid [51,52]. However, the lack of tools to precisely locate PtdIns(3,5)P₂ and specifically block its downstream signaling are major limitations to get a better knowledge of its functions. Current data suggest that PtdIns3P, PtdIns5P and PtdIns(3,5)P₂ are highly connected and that the interconversion between these lipids could be at the basis of the tight regulation and coordination of vesicular trafficking and cytoskeleton dynamics.

2.6. PtdIns(4,5)P₂ [1]

As abundant as PtdIns4P, this lipid is predominantly present in the inner leaflet of the plasma membrane. PtdIns(4,5)P₂ has also been found in the Golgi apparatus, in endosomes, in the endoplasmic reticulum and in the nucleus. Six different kinases control its biosynthesis in a spatiotemporal manner. PIP5Ks α , β and γ (also called type I PIPK (α , β , and γ)) use PtdIns4P as a substrate and produce the majority of PtdIns(4,5)P₂ (protein domains are shown in Fig. 2). PIP4K2 A, B and C (also called type II PIP4K α , β and γ) phosphorylate PtdIns5P at the position 4 to produce a quantitatively minor (but probably very localized) pool of PtdIns(4,5)P₂ (protein domains are shown in Fig. 2).

Historically, the first reports concerning this lipid highlighted the fact that it is the preferred substrate of phospholipase C (PLC) which, upon cellular activation, produce the second messengers inositol trisphosphate (Ins(1,4,5)P₃) and diacylglycerol (DAG). Few years later, it was shown that Class I PI3Ks also use PtdIns(4,5)P₂ as a substrate to produce the second messenger PtdIns(3,4,5)P₃. Thus, PtdIns(4,5)P₂ is at the origin of three fundamental intracellular second messengers. Moreover, it is now well established that PtdIns(4,5)P₂ directly interacts with proteins through specific domain (PH, ENTH, FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin)). Through these interactions, it modulates several regulators of the actin cytoskeleton, but also some ion channels. PtdIns(4,5)P₂ is thus a very important lipid directly or indirectly involved in various biological functions.

2.7. PtdIns(3,4,5)P₃ [2]

This PI is a typical lipid second messenger. It is present in trace amounts in quiescent cells and is rapidly and transiently produced by Class I PI3K activation following membrane receptors triggering (protein domains are shown in Fig. 2). PtdIns(3,4,5)P₃ is produced mainly in the inner leaflet of the plasma membrane where it recruits and activates PH domain-containing proteins including the well known protein kinase Akt [53]. Among the different PH domain-containing proteins recruited by this lipid one can note exchange factors of Arf (ARNO and GRP1) or Rac (PREX1 and Vav) [54], tyrosine kinases such as Btk and adapter proteins like GAB1. Some of these PH domains are used to localize PtdIns(3,4,5)P₃ by imaging. In summary, this lipid is highly involved in the formation and the organization of intracellular signaling complexes and thus

regulates cell proliferation and survival but also glucose homeostasis, and other processes such as cell polarization [55] and motility [56].

3. How to quantify and localize phosphoinositides?

3.1. Quantification

Different approaches have been developed to quantify PIs including [³²Pi] or [³H]-myo-inositol metabolic labeling followed by HPLC analysis, mass assay using specific recombinant kinases and more recently mass spectrometry-based measurements.

3.1.1. [³²Pi] or [³H]-myo-inositol metabolic labeling

The general procedure of this approach is as follows: i) extract PIs from [³²Pi] or [³H]-myo-inositol-labeled cells (after stimulation with an agonist for example); ii) separate the different families of PIs by thin layer chromatography (this step is optional) and iii) deacetylate them and separate the resulting glyceroinositol phosphates by anion-exchange HPLC [57]. Separations between each species can be easily performed using a single column except for PtdIns5P, which efficient separation from PtdIns4P requires two anion-exchange HPLC columns mounted in series [27]. One major drawback of this assay is that it does not allow quantification of PIs from biological samples such as tissues biopsies. Furthermore, to detect an increase in mass rather than a change in the turn-over, it is essential to reach the isotopic equilibrium, which is not always possible, for example when primary cells are used. Moreover, this assay requires relatively high amounts of radioactivity and large number of cells.

3.1.2. Mass assay

These assays are based on the phosphorylation of the PI to be quantified by a recombinant specific lipid kinase in the presence of [γ -³²P]ATP to generate a new radioactive polyphosphorylated PI. For example, PtdIns5P can be transformed into PtdIns(4,5)P₂ using recombinant PIP4K2 α [58] and PtdIns3P into PtdIns(3,5)P₂ by using recombinant PIKfyve [12]. It is important to note that, *in vitro*, an enzyme may not be strictly specific for one lipid and the nature of the radioactive product of the kinase reaction must be clearly identified (using HPLC) to define the best experimental conditions. It is noteworthy that these assays require less radioactivity than the metabolic labeling described above, but generally a large number of cells is needed.

3.1.3. Mass spectrometry

Recently, a mass spectrometry method has been developed to quantify PtdIns(3,4,5)P₃ [59]. It is based on the methylation of the phosphate groups of PIs with TMS-diazomethane coupled to HPLC-mass spectrometry analysis. This very efficient and sensitive method allows the quantification of the different molecular species of PtdIns(3,4,5)P₃ (i.e. the different composition in fatty acyl chains) extracted from any biological samples. It is also possible to quantify PtdIns, PtdInsP and PtdInsP₂ by this method but, unfortunately, it is still impossible to distinguish between the PtdInsP and the PtdInsP₂ isomers because of similar molecular weights and charges.

3.2. Localization

It is possible to localize PIs by imaging using PI-binding domains (Fig. 1, top right). These domains can either be used as recombinant proteins or be overexpressed as fluorescent-tag fusions. Recombinant proteins (generally GST tagged) are used on fixed and permeabilized cells, and are then detected using an anti-tag antibody and a secondary antibody coupled to a fluorophore. This two steps

approach using antibodies can be bypassed by directly labeling the PI-binding domain with a fluorophore or by adding a fluorescent tag (GFP or mCherry for example). Another approach is to use antibodies specifically directed against PIs. Since lipids cannot be fixed, caution should be taken during the fixation and permeabilization procedures, as described by Hammond et al. [60]. In the case of overexpression of PI-binding domains, the major drawback is that it cannot be applied to tissues or clinical samples. Moreover, the overexpression of PI-binding proteins may prevent endogenous proteins to interact with their cognate PIs, thereby competing with their endogenous target proteins and interfering with downstream signaling. As a consequence, this approach is often used to block the effect of a specific PI or to localize newly synthesized pools of a PI following a specific stimulus.

4. Phosphoinositide-metabolizing enzymes and pathologies

As illustrated in Table 1 and Fig. 1 (bottom panel), loss or gain of function mutations in many PI-metabolizing enzymes are involved in human pathologies. Some genetic diseases such as muscular dystrophy or Charcot-Marie-Tooth myotubular neuropathy are due to mutations in PtdIns3P/PtdIns(3,5)P₂ 3-phosphatases of the myotubularin family [61]. Lowe syndrome or Francois-Neetens speckled corneal dystrophy are due to mutations in genes coding for the PtdIns(4,5)P₂ 5-phosphatase OCRL and the 5-kinase PIKfyve, respectively. Moreover, the involvement of class I PI3Ks and the PtdIns(3,4,5)P₃ 3-phosphatase PTEN in cancer is well documented [62,63] and new molecules modulating this pathway are now available in clinic, as commented below.

5. Targeting PI3K in cancer and thrombosis

PI3K activity associated with a viral oncoprotein was a major discovery by L. Cantley and colleagues in the late 80s [64,65]. Thirty years later, inhibitors of PI3K start to be used in clinic. Indeed, idelalisib, a selective inhibitor of class I PI3K δ , has just been approved by the “Food and Drug Administration” (FDA) in the US for the treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL) and indolent non-Hodgkin lymphoma (NHL). Inhibitors of class I PI3K α , which is often mutated in cancer, have entered clinical trials, as well pan Class I PI3K inhibitors. Some result also suggest a potential

therapeutic application for Class III PI3K inhibitors in cancer therapy [66]. Moreover, selective inhibitors of PI3K β are under development to target platelets in the prevention of arterial thrombosis.

5.1. Class I PI3K and cancer

5.1.1. PI3K α

PI3K α (PIK3CA) is ubiquitous and plays a major role in cell proliferation and survival as well as insulin receptor signaling. It is now a validated therapeutic target in oncology because gain of function mutations are frequently found in solid cancers in humans [67]. Experimental studies using cell lines and genetically modified mice have demonstrated that two frequently found activating mutations (E545K and H1047R) are sufficient to induce an increase in the level of PtdIns(3,4,5)P₃ and to transform cells [68]. In addition, the presence of these mutations sensitize cells to PI3K α and mTORC1 pathway inhibitors. Independently of gain-of-function mutations, PI3K α is activated by many oncogenes and loss of function mutations in the PTEN phosphatase lead to an over-activation of oncogenic signaling pathway.

Some selective PI3K α inhibitors have entered clinical trials for the treatment of solid cancers with an activating mutation of this kinase. The effect of these inhibitors as monotherapy are relatively limited but their combination with other drugs used in chemotherapy or specifically targeting Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) could yield very interesting results (L. Cantley, personal communication, October 2014). PI3K α inhibitors could also be useful in the treatment of rare hereditary pathologies associated with somatic mutations of PIK3CA (overgrowth syndromes [69]). Finally, under certain conditions, pan-class I PI3K inhibitors could avoid compensation mechanism by another isoform from this class of lipid kinases [70].

5.1.2. PI3K δ

PI3K δ is primarily expressed in leukocytes where it plays a key role downstream of antigen receptor in B-cells (BCR) [71]. BCR signaling uses tyrosine phosphorylation of ITAM motifs-based mechanisms (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) of the intracytoplasmic portion of CD79 to form multiprotein complexes. Syk and Btk tyrosine kinases as well as PI3K δ are key elements of BCR signaling. PI3K δ also plays an important role

Table 1
Phosphoinositides and pathophysiology.

Diseases	Genes (protein)	Modifications	Ref.
Lowe syndrome	OCRL	Mutation	[87]
Dent disease	OCRL	Mutation	[88]
Lethal contractural syndrome type 3	PIP5K1C (PtdIns(4)P-5-Kinase 1 Gamma)	Mutation	[89]
Centronuclear X-linked myopathy	MTM1	Mutation	[90]
Charcot-Marie-Tooth disease	MTMR14	Mutations	[90]
	MTMR2		
	MTMR5		
	MTMR13		
	FIG4		
François-Neetens mouchetée fleck corneal dystrophy	PIP5K3 (PIKfyve)	Mutation	[91]
Cowden syndrome/Cancer	PTEN	Mutation	[92]
Cancer	PIK3CA (Classe I PI3K alpha)	p110 α mutation, amplification	[93]
Ataxia-oculomotor apraxia 3	PIK3R5 (PI3K p101 subunit)	Mutation	[94]
Agammaglobulinemia	PIK3R1 (PI3K subunit p85 α)	Mutation leading to gene deletion	[95]
Activated PI3K-delta syndrome	(PIK3CD) PI3K p110 δ subunit	Activating mutation	[96]
Megalencephaly capillary malformation	PIK3R2 (p85 β sub-unit PI3K)/PIK3CA (p110 α subunit PI3K)	Mutation	[97]
Cancer (AML, ALL)	INPP5D (SHIP1)	Mutation	[98]
Type 2 diabetes	INPPL1 (SHIP2)	16 bp deletion	[99]
Opsismodysplasia.	INPPL1 (SHIP2)	Mutation	[100]
Morm and Joubert syndromes	INPP5E	Mutation	[101]
Down syndrome/Parkinson disease	SYNJ1 (Synaptojanin 1)	Amplification	[102]
Segmental overgrowth syndrome	PIK3CA (Class I PI3K alpha)	Mutation	[69]

downstream of cytokines/chemokines and adhesion receptors, which strongly contributes to the regulation of proliferation, differentiation, migration and survival of B cells. CLL, the most common leukemia in western Europe, is characterized by an accumulation of B cells (CD5 +) in blood, bone marrow and secondary lymphoid organs. Chronic activation of BCR signaling plays a major role in the pathophysiology and progression of this hematologic malignancy and also in B cells indolent NHL. It is uncommon to observe mutations in genes coding for class I PI3Ks in CLL and indolent NHL. Similarly, the incidence of loss of function mutations in the gene encoding the PTEN phosphatase is low in these pathologies (except for the mantle NHL). However, many studies have shown that *ex vivo* inhibition of PI3K δ affects the proliferation and survival of CLL patients cells [72]. The first clinical trials with selective PI3K δ inhibitor (CAL-101 or idelalisib) in relapsing patients showed very encouraging and sustained response with a quick exit of malignant B cells from lymphoid organs accompanied by a transitional hyperlymphocytosis [73,74]. It is important to note that stopping treatment causes a reappearance of the pathology. PI3K δ inhibition decreases BCR signaling but also the production of chemokines and the response of malignant B cells to chemokines, thus affecting their migration and anchorage to the protective niche provided by the lymphoid tissues. The exit of these cells from the niche reduces the proliferation and survival signals resulting in their progressive death by apoptosis. When idelalisib is associated with molecules such as rituximab (anti-CD20 used to treat these diseases), the destruction of these cells is accelerated. Side effects of idelalisib appeared tolerable to consider a long-term treatment. In France, idelalisib has obtained a temporary authorization for the treatment of relapsed CLL and for refractory follicular NHL with the molecule used as monotherapy or in combination.

In the future, it is conceivable that PI3K δ inhibitors will also be used in the treatment of some immune diseases linked to hyperactivation of PI3K δ [75] and for the treatment of non-hematological solid tumors [76].

5.2. PI3K β and arterial thrombosis

Blood platelets play a key role in haemostasis and thrombosis. They express all class I PI3K isoforms, but the class I PI3K β plays the most important role in this model [77]. A selective inhibitor of PI3K β (TGX-221) showed an *ex vivo* antithrombotic potential in arterial flow condition and in *in vivo* experimental thrombosis rat models [78]. The use of mice expressing an inactive p110 β or mice deleted of p110 β selectively in megakaryocytes and platelets has demonstrated the role of the PI3K downstream of different seven-transmembrane domain receptors (thrombin, thromboxane A2 or ADP receptors), ITAM receptors (collagen receptor GPVI) and integrins (α IIb β 3 and α 2 β 1) [79–81]. One of the amplification loops of platelet activation involves ADP (secreted by platelets at the beginning of activation) and its purinergic receptor P2Y12 (coupled to Gi). The β/γ subunits of Gi interact with p110 β , which potentiates PI3K β activation. This amplification loop, characteristic of platelets, could explain the predominant role of PI3K β in this model. PtdIns(3,4,5)P₃ production contributes to the recruitment and activation of several PH domain proteins such as Akt, Btk and PLC γ 2. With these mouse models, it has been clearly shown that the inhibition of PI3K β has an antithrombotic effect without affecting primary haemostasis and without increasing the bleeding risk [82]. A Phase I clinical trial done with a new selective PI3K β inhibitor (AZD6482) also shows no increasing risk of bleeding and indicates a good tolerability of the compound in humans [83,84]. *Ex-vivo* experiments confirm the earlier results and underline the importance of this type of inhibitor in the prevention of arterial thrombosis. However, we have recently shown that in pathological

arterial flow conditions (during arterial stenosis or during partially occlusive thrombus formation), PI3K β inhibition causes thrombus fragmentation with a potential risk of distal embolization which may occlude downstream microvessels [85,86]. In summary, targeting PI3K β for the prevention of arterial occlusive thrombosis has a number of benefits (limited bleeding risk, bearable side effects, rapid and reversible effect on arterial thrombosis). It will be, however, essential to determine whether the released thrombus fragments in certain conditions are potentially dangerous or are likely to be dislocated without causing downstream ischemic events.

6. Conclusion

PIs are a family of lipids that strongly contributes to the assembly and the spatiotemporal organization of multi-protein complexes. They are critical to coordinate the maintenance of cellular territories integrity, the organization of signaling pathways, the regulation of intracellular trafficking, the dynamics of cytoskeleton and the cell polarity. A set of specific kinases and phosphatases precisely controls the production and interconversion of the different PIs. A loss of this strict control (due to mutations or modulation of the expression of some of the PI-metabolizing enzymes) leads to pathologies. It is therefore important to characterize the regulatory mechanisms of these kinases and phosphatases and continue the analysis of the role of the different PIs. The recent emergence of class I PI3K inhibitors in clinic illustrates how advances in the understanding of lipid signaling mechanisms can improve the management of some diseases.

Competing interests

The authors declare that they have no competing financial interests.

Acknowledgment

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (ANR-13-BSV2-0004-01), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), Inserm, la ligue contre le cancer and the Fondation pour la Recherche Médicale. BP is a senior member of the Institut Universitaire de France.

References

- [1] Y. Sun, N. Thapa, A.C. Hedman, R.A. Anderson, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: targeted production and signaling, *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 35 (2013) 513–522.
- [2] R.S. Salamon, J.M. Backer, Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate: tool of choice for class I PI 3-kinases, *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 35 (2013) 602–611.
- [3] K.O. Schink, C. Raiborg, H. Stenmark, Phosphatidylinositol 3-phosphate, a lipid that regulates membrane dynamics, protein sorting and cell signalling, *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 35 (2013) 900–912.
- [4] M.A. De Matteis, C. Wilson, G. D'Angelo, Phosphatidylinositol-4-phosphate: the Golgi and beyond, *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 35 (2013) 612–622.
- [5] A. Gassama-Diagne, B. Payrastre, Phosphoinositide signaling pathways: promising role as builders of epithelial cell polarity, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 273 (2009) 313–343.
- [6] M. Falasca, et al., The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 28226–28236.
- [7] C. Valet, et al., Essential role of class II PI3K-C2alpha in platelet membrane morphology, *Blood* 126 (2015) 1128–1137.
- [8] I. Ivetac, et al., The type Ialpha inositol polyphosphate 4-phosphatase generates and terminates phosphoinositide 3-kinase signals on endosomes and the plasma membrane, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 2218–2233.
- [9] J.E. Slessareva, S.M. Rouff, B. Temple, V.A. Bankaitis, H.G. Dohlman, Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome, *Cell* 126 (2006) 191–203.
- [10] A. Kihara, T. Noda, N. Ishihara, Y. Ohsumi, Two distinct Vps34

- phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Cell Biol.* 152 (2001) 519–530.
- [11] L. Tawk, et al., Phosphatidylinositol 3-phosphate, an essential lipid in Plasmodium, localizes to the food vacuole membrane and the apicoplast, *Eukaryot. Cell* 9 (2010) 1519–1530.
- [12] G. Chicanne, et al., A novel mass assay to quantify the bioactive lipid PtdIns3P in various biological samples, *Biochem. J.* 447 (2012) 17–23.
- [13] T. Proikas-Cezanne, Z. Takacs, P. Donnes, O. Kohlbacher, WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome, *J. Cell Sci.* 128 (2015) 207–217.
- [14] V. Dominguez, et al., Class II phosphoinositide 3-kinase regulates exocytosis of insulin granules in pancreatic beta cells, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 4216–4225.
- [15] C. Ellison, K. Davidson, K. Anderson, L.R. Stephens, P.T. Hawkins, PtdIns3P binding to the PX domain of p40phox is a physiological signal in NADPH oxidase activation, *EMBO J.* 25 (2006) 4468–4478.
- [16] A.P. Sagona, et al., PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody, *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 362–371.
- [17] D. Lu, et al., Phosphatidylinositol 4-kinase IIalpha is palmitoylated by Golgi-localized palmitoyltransferases in cholesterol-dependent manner, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 21856–21865.
- [18] Y.J. Wei, et al., Type II phosphatidylinositol 4-kinase beta is a cytosolic and peripheral membrane protein that is recruited to the plasma membrane and activated by Rac-GTP, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 46586–46593.
- [19] A. Godi, et al., ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P2 on the Golgi complex, *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) 280–287.
- [20] A. Hausser, et al., Phospho-specific binding of 14-3-3 proteins to phosphatidylinositol 4-kinase III beta protects from dephosphorylation and stabilizes lipid kinase activity, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 3613–3621.
- [21] A. Blagoveshchenskaya, et al., Integration of Golgi trafficking and growth factor signaling by the lipid phosphatase SAC1, *J. Cell Biol.* 180 (2008) 803–812.
- [22] M. de Saint-Jean, et al., Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers, *J. Cell Biol.* 195 (2011) 965–978.
- [23] G. D'Angelo, M. Vicinanza, A. Di Campli, M.A. De Matteis, The multiple roles of PtdIns(4)P – not just the precursor of PtdIns(4,5)P2, *J. Cell Sci.* 121 (2008) 1955–1963.
- [24] L. Demmel, et al., The clathrin adaptor Gga2p is a phosphatidylinositol 4-phosphate effector at the Golgi exit, *Mol. Biol. Cell* 19 (2008) 1991–2002.
- [25] E. Mizuno-Yamasaki, M. Medkova, J. Coleman, P. Novick, Phosphatidylinositol 4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p, *Dev. Cell* 18 (2010) 828–840.
- [26] J. Viaud, F. Boal, H. Tronchere, F. Gaits-Iacovoni, B. Payrastrre, Phosphatidylinositol 5-phosphate: a nuclear stress lipid and a tuner of membranes and cytoskeleton dynamics, *BioEssays news Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 36 (2014) 260–272.
- [27] D. Sarkes, L.E. Rameh, A novel HPLC-based approach makes possible the spatial characterization of cellular PtdIns5P and other phosphoinositides, *Biochem. J.* 428 (2010) 375–384.
- [28] O. Gozani, et al., The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor, *Cell* 114 (2003) 99–111.
- [29] K. Niebuhr, et al., Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the S.flexneri effector IpgD reorganizes host cell morphology, *EMBO J.* 21 (2002) 5069–5078.
- [30] C. Pendaries, et al., PtdIns5P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during *Shigella flexneri* infection, *EMBO J.* 25 (2006) 1024–1034.
- [31] D. Ramel, et al., *Shigella flexneri* infection generates the lipid PI5P to alter endocytosis and prevent termination of EGFR signaling, *Sci. Signal.* 4 (2011) ra61.
- [32] F. Boal, et al., TOM1 is a PI5P effector involved in the regulation of endosomal maturation, *J. Cell Sci.* 128 (2015) 815–827.
- [33] A. Puhar, H. Tronchere, B. Payrastrre, G.T. Nhieu, P.J.A. Sansonetti, *Shigella* effector dampens inflammation by regulating epithelial release of danger signal ATP through production of the lipid mediator PtdIns5P, *Immunity* 39 (2013) 1121–1131.
- [34] G. Guittard, et al., Cutting edge: Dok-1 and Dok-2 adaptor molecules are regulated by phosphatidylinositol 5-phosphate production in T cells, *J. Immunol.* 182 (2009) 3974–3978.
- [35] D. Sbrissa, O.C. Ikononov, J. Strakova, A. Shisheva, Role for a novel signaling intermediate, phosphatidylinositol 5-phosphate, in insulin-regulated F-actin stress fiber breakdown and GLUT4 translocation, *Endocrinology* 145 (2004) 4853–4865.
- [36] J. Viaud, et al., Phosphatidylinositol 5-phosphate regulates invasion through binding and activation of Tiam1, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4080.
- [37] M. Vicinanza, et al., PI(5)P regulates autophagosome biogenesis, *Mol. Cell* 57 (2015) 219–234.
- [38] J. Xie, C. Erneux, I. Pirson, How does SHIP1/2 balance PtdIns(3,4)P2 and does it signal independently of its phosphatase activity? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 35 (2013) 733–743.
- [39] Y. Posor, et al., Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate, *Nature* 499 (2013) 233–237.
- [40] H. Li, A.J. Marshall, Phosphatidylinositol (3,4) bisphosphate-specific phosphatases and effector proteins: a distinct branch of PI3K signaling, *Cell. Signal.* 27 (2015) 1789–1798.
- [41] S. Wullschlegler, D.H. Wasserman, A. Gray, K. Sakamoto, D.R. Alessi, Role of TAPP1 and TAPP2 adaptor binding to PtdIns(3,4)P2 in regulating insulin sensitivity defined by knock-in analysis, *Biochem. J.* 434 (2011) 265–274.
- [42] E. Boucrot, et al., Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway, *Nature* 517 (2015) 460–465.
- [43] M. Krause, et al., Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics, *Dev. Cell* 7 (2004) 571–583.
- [44] T. Oikawa, T. Itoh, T. Takenawa, Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells, *J. Cell Biol.* 182 (2008) 157–169.
- [45] A.J. McCartney, Y. Zhang, L.S. Weisman, Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: low abundance, high significance, *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 36 (2014) 52–64.
- [46] D. Sbrissa, O.C. Ikononov, A. Shisheva, Phosphatidylinositol 3-phosphate-interacting domains in PIKfyve. Binding specificity and role in PIKfyve. Endomembrane localization, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6073–6079.
- [47] K. Hnia, I. Vaccari, A. Bolino, J. Laporte, Myotubularin phosphoinositide phosphatases: cellular functions and disease pathophysiology, *Trends Mol. Med.* 18 (2012) 317–327.
- [48] J. de Lartigue, et al., PIKfyve regulation of endosome-linked pathways, *Traffic* 10 (2009) 883–893.
- [49] Y. Zhang, et al., Loss of Vac14, a regulator of the signaling lipid phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate, results in neurodegeneration in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 17518–17523.
- [50] A.C. Rutherford, et al., The mammalian phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) regulates endosome-to-TGN retrograde transport, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 3944–3957.
- [51] M. Thumm, et al., It takes two to tango: PROPPINs use two phosphoinositide-binding sites, *Autophagy* 9 (2013) 106–107.
- [52] R. Krick, et al., Structural and functional characterization of the two phosphoinositide binding sites of PROPPINs, a beta-propeller protein family, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) E2042–E2049.
- [53] K.M. Vasudevan, L.A. Garraway, AKT signaling in physiology and disease, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 347 (2010) 105–133.
- [54] J. Viaud, F. Gaits-Iacovoni, B. Payrastrre, Regulation of the DH-PH tandem of guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases by phosphoinositides, *Adv. Biol. Regul.* 52 (2012) 303–314.
- [55] A. Gassama-Diagne, et al., Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 963–970.
- [56] M.A. Lemmon, K.M. Ferguson, C.S. Abrams, Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton, *FEBS Lett.* 513 (2002) 71–76.
- [57] B. Payrastrre, Phosphoinositides: lipid kinases and phosphatases, *Methods Mol. Biol.* 273 (2004) 201–212.
- [58] J.B. Morris, K.A. Hinchliffe, A. Ciruela, A.J. Letcher, R.F. Irvine, Thrombin stimulation of platelets causes an increase in phosphatidylinositol 5-phosphate revealed by mass assay, *FEBS Lett.* 475 (2000) 57–60.
- [59] J. Clark, et al., Quantification of PtdInsP3 molecular species in cells and tissues by mass spectrometry, *Nat. Methods* 8 (2011) 267–272.
- [60] G.R. Hammond, G. Schiavo, R.F. Irvine, Immunocytochemical techniques reveal multiple, distinct cellular pools of PtdIns4P and PtdIns(4,5)P(2), *Biochem. J.* 422 (2009) 23–35.
- [61] Hélène Tronchère, Alessandra Bolino, Jocelyn Laporte, Bernard Payrastrre, Myotubularins and associated neuromuscular diseases, *Clin. Lipidol.* 7 (2012) 151–162.
- [62] D.A. Fruman, C. Rommel, PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 140–156.
- [63] S.J. Leever, B. Vanhaesebroeck, M.D. Waterfield, Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage, *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 (1999) 219–225.
- [64] M. Whitman, C.P. Downes, M. Keeler, T. Keller, L. Cantley, Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate, *Nature* 332 (1988) 644–646.
- [65] L.C. Cantley, The phosphoinositide 3-kinase pathway, *Science* 296 (2002) 1655–1657.
- [66] B. Pasquier, SAR405, a PIK3C3/Vps34 inhibitor that prevents autophagy and synergizes with MTOR inhibition in tumor cells, *Autophagy* 11 (2015) 725–726.
- [67] Y. Samuels, et al., High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers, *Science* 304 (2004) 554.
- [68] L. Zhao, P.K. Vogt, Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 2652–2657.
- [69] G. Mirzaa, R. Conway, J.M. Graham Jr., W.B. Dobyns, in: R.A. Pagon, et al. (Eds.), *GeneReviews*(R), 1993 (Seattle (WA)).
- [70] D.W. Cescon, C. Gorrini, T.W. Mak, Breaking up is hard to do: PI3K isoforms on the rebound, *Cancer Cell* 27 (2015) 5–7.
- [71] S.T. Jou, et al., Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 8580–8591.
- [72] D.A. Fruman, C. Rommel, PI3Kdelta inhibitors in cancer: rationale and serendipity merge in the clinic, *Cancer Discov.* 1 (2011) 562–572.
- [73] A.K. Gopal, et al., PI3Kdelta inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma, *N. Engl. J. Med.* 370 (2014) 1008–1018.
- [74] R.R. Furman, et al., Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic

- leukemia, *N. Engl. J. Med.* 370 (2014) 997–1007.
- [75] C.M. Walsh, D.A. Fruman, Too much of a good thing: immunodeficiency due to hyperactive PI3K signaling, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 3688–3690.
- [76] K. Ali, et al., Inactivation of PI(3)K p110delta breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer, *Nature* 510 (2014) 407–411.
- [77] M.P. Gratacap, et al., Regulation and roles of PI3Kbeta, a major actor in platelet signaling and functions, *Adv. Enzyme Regul.* 51 (2011) 106–116.
- [78] S.P. Jackson, et al., PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy, *Nat. Med.* 11 (2005) 507–514.
- [79] I. Canobbio, et al., Genetic evidence for a predominant role of PI3Kbeta catalytic activity in ITAM- and integrin-mediated signaling in platelets, *Blood* 114 (2009) 2193–2196.
- [80] V. Martin, et al., Deletion of the p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase in platelets reveals its central role in Akt activation and thrombus formation in vitro and in vivo, *Blood* 115 (2010) 2008–2013.
- [81] A. Consonni, et al., Role and regulation of phosphatidylinositol 3-kinase beta in platelet integrin alpha2beta1 signaling, *Blood* 119 (2012) 847–856.
- [82] S.P. Jackson, S.M. Schoenwaelder, Antithrombotic phosphoinositide 3-kinase beta inhibitors in humans: a 'shear' delight!, *J. Thromb. Haemost.* JTH 10 (2012) 2123–2126.
- [83] S. Nylander, et al., Human target validation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K)beta: effects on platelets and insulin sensitivity, using AZD6482 a novel PI3Kbeta inhibitor, *J. Thromb. Haemost.* JTH 10 (2012) 2127–2136.
- [84] S. Nylander, F. Wagberg, M. Andersson, T. Skarby, D. Gustafsson, Exploration of efficacy and bleeding with combined phosphoinositide 3-kinase beta inhibition and aspirin in man, *J. Thromb. Haemost.* 13 (2015) 1494–1502.
- [85] P.A. Laurent, et al., Platelet PI3Kbeta and GSK3 regulate thrombus stability at a high shear rate, *Blood* 125 (2015) 881–888.
- [86] M. Torti, PI3Kbeta inhibition: all that glitters is not gold, *Blood* 125 (2015) 750–751.
- [87] O. Attree, et al., The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase, *Nature* 358 (1992) 239–242.
- [88] R.R. Hoopes Jr., et al., Dent Disease with mutations in OCRL1, *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005) 260–267.
- [89] G. Narkis, et al., Lethal contractural syndrome type 3 (LCCS3) is caused by a mutation in PIP5K1C, which encodes PIPKI gamma of the phosphatidylinositol pathway, *Am. J. Hum. Genet.* 81 (2007) 530–539.
- [90] L. Amoaşii, K. Hnia, J. Laporte, Myotubularin phosphoinositide phosphatases in human diseases, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 362 (2012) 209–233.
- [91] S. Li, et al., Mutations in PIP5K3 are associated with Francois-Neetens mouchettee fleck corneal dystrophy, *Am. J. Hum. Genet.* 77 (2005) 54–63.
- [92] C.A. Worby, J.E. Dixon, *Pten. Annu. Rev. Biochem.* 83 (2014) 641–669.
- [93] J.E. Burke, R.L. Williams, Synergy in activating class I PI3Ks, *Trends Biochem. Sci.* 40 (2015) 88–100.
- [94] N. Al Tassan, et al., A missense mutation in PIK3R5 gene in a family with ataxia and oculomotor apraxia, *Hum. Mutat.* 33 (2012) 351–354.
- [95] M.E. Conley, et al., Agammaglobulinemia and absent B lineage cells in a patient lacking the p85alpha subunit of PI3K, *J. Exp. Med.* 209 (2012) 463–470.
- [96] I. Angulo, et al., Phosphoinositide 3-kinase delta gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage, *Science* 342 (2013) 866–871.
- [97] J.B. Riviere, et al., De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes, *Nat. Genet.* 44 (2012) 934–940.
- [98] S. Fernandes, S. Iyer, W.G. Kerr, Role of SHIP1 in cancer and mucosal inflammation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1280 (2013) 6–10.
- [99] A. Suwa, T. Kurama, T. Shimokawa, SHIP2 and its involvement in various diseases, *Expert Opin. Ther. Targets* 14 (2010) 727–737.
- [100] E.C. Chai, R.R. Singaraja, Opsismodysplasia: implications of mutations in the developmental gene INPPL1, *Clin. Genet.* 83 (2013) 527–529.
- [101] M. Jacoby, et al., INPP5E mutations cause primary cilium signaling defects, ciliary instability and ciliopathies in human and mouse, *Nat. Genet.* 41 (2009) 1027–1031.
- [102] E.L. Clayton, S. Minogue, M.G. Waugh, Phosphatidylinositol 4-kinases and PI4P metabolism in the nervous system: roles in psychiatric and neurological diseases, *Mol. Neurobiol.* 47 (2013) 361–372.