



HAL
open science

Régulation phosphoinositide-dépendante de mTORC1 dans le muscle squelettique : voies moléculaires et implication dans la myopathie myotubulaire

Mélanie Picot

► To cite this version:

Mélanie Picot. Régulation phosphoinositide-dépendante de mTORC1 dans le muscle squelettique : voies moléculaires et implication dans la myopathie myotubulaire. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. ⟨NNT : 2022TOU30236⟩. ⟨tel-04075336⟩

HAL Id: tel-04075336

<https://theses.hal.science/tel-04075336v1>

Submitted on 20 Apr 2023

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.



HAL Authorization



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Mélanie PICOT

Le 16 décembre 2022

Régulation phosphoinositide-dépendante de mTORC1 dans le muscle squelettique : voies moléculaires et implication dans la myopathie myotubulaire.

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Unité de recherche :
I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par
Karim HNIA et Julien VIAUD

Jury

Mme Sylvie FRIANT, Rapporteur
M. Fabien ALPY, Rapporteur
M. Etienne MOREL, Rapporteur
M. Thierry LEVADE, Examineur
Mme Perrine CASTETS, Examinatrice
M. Karim HNIA, Directeur de thèse
M. Julien VIAUD, Co-directeur de thèse

Remerciement

Je remercie, en premier lieu, Sylvie Friant, Perrine Castets, Thierry Levade, Fabien Alpy et Etienne Morel d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci pour cette discussion scientifique très enrichissante et agréable qui a fait de cette soutenance un merveilleux souvenir.

Un grand merci et de la reconnaissance à l'association française contre la myopathie (AFM-Téléthon) et Myotubular Trust pour le soutien tout au long de ces quatre années de thèse.

Merci à Karim Hnia, je n'aurais pas rêvé meilleur encadrement. Tu as su me pousser quand il fallait et me soutenir quand j'en avais besoin. Grâce à toi j'ai trouvé mTOR et le muscle passionnant, j'ai appris énormément (relativiser, me débrouiller avec du polystyrene, m'organiser, sentir les tampons pour deviner leur composition, présenter ... et j'en passe). Travailler avec toi fut un réel bonheur tout du long, rendant tout plus facile, un formidable duo !

Merci également à Julien Viaud qui m'a soutenu jusqu'au bout, mon sauveur quand les manips ne voulaient décidément pas marcher, quand les protos étaient flous et qui a répondu déjà une centaine de fois au fameux « C'est où ça ? ». Tu as rendu quelques journées palpitantes/inquiétantes quand on ne savait pas si aujourd'hui c'était une bombe de carboglace, de veilles photos collées aux portes, du scotch sous la souris où se faire battre à plate couture au blind-test RTL2 ... vengeance Ça fait 4 ans que je te pique ton café !!

Merci également à Bernard Payraastre de m'avoir accueilli dans cette superbe équipe !

En 4 ans j'ai connu deux groupes de thésard, les « PIs girls » avec qui tout a commencé, Typhaine, l'ancienne ; Manuella, la coupine et Mélanie-1, la grande Mélanie ! Et que dire sur vous trois... Plus que des collègues, vous êtes devenues des amies très chère. Nous avons eu de nombreux souvenirs ensemble avec ce congrès à Strasbourg chez les bonnes sœurs où on était tellement fatigué que notre premier jour de week-end on la passait à dormir en vrac ; tous ces petits moments au bureau ; notre crédo du positivisme ; les appelle Facetime alors qu'on était juste dans des pièces séparées ... par 20 secondes de marche ... Vous avez été magique pour moi ! Et évidemment impossible de passer à côté du seul mec qui était avec nous, notre fabuleux Antoine Oprescu, qui j'espère se souviens encore que j'aie été son

meilleur publique pour ces jeux de mots Vraiment pas fufou (time-vie ... pour timeur ... y a qu'avec moi que ça fonctionnait non ?), au moins nos galères communes pour de simple

WB ça, ça faisait marrer tout le monde !

Merci également aux formidables Lucile Grzesiak, Marie-Kerguelen Sarthou et Amandine Wahart qui m'ont permis des petites pauses très agréables et rigolotes dans leur bureau !

Et merci également au « nouveau » groupe de thésard, Nesrine Hifdi et Mathilde Vaucourt, à peine arrivée que tout le monde est obligé de les adorer, un exemple de bonne humeur et de sympathie communicative. A vous deux vous m'aurez bien nourri dans ce bureau ! Merci pour votre soutien, pour m'avoir remonté le moral jusqu'au dernier moment, pour toutes ces manip où vous m'avez aidé, et j'en passe !!! Je suis persuadé que tout se passera bien pour vous ! Maxime Borret, mon copain-pokémon ! Afi-Oportune Kpotor, Marine Marseillac, Honora Labrana ; merci à vous aussi, vous rencontrer et discuter avec vous a été un réel plaisir, je vous souhaite tout le meilleur pour la suite !!

Merci aussi à tous les autres membres de cette formidable équipe, Gaetan Chicanne, que je remercie vraiment pour tout le travail qu'il a fourni pour ce papier ; Jean-Marie Xuereb, mon partenaire de bureau tout au long de ma thèse qui m'a énormément soutenu ; Marie-Vandromme, la douceur incarnée ; Sonia Séverin, Marie Bello, Alicia Vauclard, Marie-Pierre Gratacap, Anne-Domionique Terrise, Cédric Garcia, Agnès Ribes. Merci aussi aux membres de l'équipe Laffargue, Murielle Laffargue, Stéphanie Gayral, Nicole Malet, Alexis Fay, Romain Solignac, Natalia Smirnova, Damien Ramel et ceux déjà citer. Passer mes journées à vous côtoyer a été un réel bonheur, je ne vous remercierais jamais tous assez !

Je voudrais aussi remercier les membres de mon comité de thèse, Christel Lutz et Loic Duprés, pour leurs conseils, discussions et remarques constructives.

Enfin merci à ma famille, mes parents, ma sœur et ma mamimiche, pour leur soutien et leur amour. Merci à tous mes ami(e)s, du milieu de la science ou non. Petite mention à Steven Fried connu en master 2 quand il finissait sa thèse, devenue l'un de mes meilleurs amis, et qui m'a énormément aidé ! Enfin merci à JP, je crois bien que ça va faire 12 ans qu'on se supporte, on s'est vu changer depuis nos 16 ans à bientôt la trentaine mais tu m'as toujours soutenue... je ne vais pas m'étaler sur des déclarations d'amour mais si un jour tu lis ces lignes ... merci !

Résumé

Les phosphoinositides (PI) sont des lipides seconds messagers impliqués dans de multiples fonctions cellulaires. Leur importance est soulignée par un grand nombre de pathologies liées à des mutations d'enzymes intervenant dans leur métabolisme. Parmi ces PIs, le PI3P et le PI(3,5)P₂ sont deux substrats d'une PI-3-phosphatase nommée la myotubularine ou MTM1. Des mutations dans le gène *MTM1* sont à l'origine de la myopathie centronucléaire liée à l'X (XLCNM). Il a été montré que la perte de MTM1 induit une accumulation de PI3P, dans les cellules musculaires de souris modèle *Mtm1*-KO. Cependant, les conséquences moléculaires et les retombées physiopathologiques de la dérégulation des substrats et des produits de MTM1 restent encore inconnues. Des observations antérieures montrent une altération de la balance anabolisme-catabolisme dans des cellules musculaires déplétées de l'expression de MTM1. En effet, les deux voies majeures de la dégradation cellulaire : l'UPS (ubiquitin proteasome system) et l'autophagie sont dérégulées dans ce modèle. Un rôle direct de MTM1 dans la régulation de composant de l'UPS a été proposé alors que son rôle dans l'anabolisme reste encore à explorer. Dans ce cadre, l'exploration des voies majeures de l'anabolisme par un crible pharmacologique sur des cellules musculaires *Mtm1*-KO a permis à mon équipe de mettre en évidence une hyperactivation de la voie mTORC1 (mammalian Target rapamycin complex 1). C'est un complexe majeur qui régit la croissance cellulaire et inhibe la dégradation cellulaire en réprimant l'autophagie. L'équipe a confirmé la suractivation de la voie mTORC1 dans les cellules musculaires différenciées (de souris et de patients) mais aussi dans le muscle adulte du modèle murin *Mtm1*-KO. De façon intéressante, l'inhibition pharmacologique de cette voie à des bénéfices certains sur la différenciation des myotubes mais aussi sur la fonction musculaire, et la survie des souris *Mtm1*-KO.

Partant de ces constats, mon projet de thèse a eu pour objectif de déterminer le lien moléculaire entre *Mtm1*, ces substrats lipidiques et mTORC1. Ainsi nous avons exploré l'organelle clé de recrutement et de l'activation de mTORC1 ; le lysosome. Nous avons alors émis l'hypothèse que MTM1 et ses substrats agissent sur l'assemblage de mTORC1 sur ce compartiment cellulaire. L'utilisation des modèles cellulaires de XLCNM, appuyée par des stratégies de protéomique, métabolomique et lipidomique à l'échelle du lysosome, nous a permis de mettre en évidence un lien moléculaire entre le PI3P et le PI(3,5)P₂ et le sous complexe RAGULATOR(LAMTOR)-RagGTPase: l'axe d'activation de mTORC1 par les acides aminés. Nous avons montré que l'accumulation du PI3P et le PI(3,5)P₂ sur le lysosome favorise la formation et la stabilité du complexe LAMTOR-RagGTPase et ainsi prédispose

mTORC1 à une activation permanente. Ainsi, un taux régulé de PI3P et le PI(3,5)P₂ servirait de plateforme pour le complexe LAMTOR-RagGTPase pour permettre une activation de mTORC1 indépendamment des flux de nutriments. Néanmoins, une accumulation de ces lipides induit une suractivation de mTORC1 avec des retombées néfastes sur la différenciation et la fonction musculaire. Enfin ; notre étude propose l'utilisation d'inhibiteurs de mTORC1 comme un outil thérapeutique intéressant contre cette myopathie qui, à ce jour, reste incurable.

Abstract

Phosphoinositides are secondary lipid messenger involved in multiple cellular functions. The PI3P and PI(3,5)P₂ are two substrates of a PI-3-phosphatase named the myotubularin or MTM1. Mutation in the *MTM1* gene are at the origin of the X-linked Centronuclear Myopathy (XLCNM). It was shown that MTM1 loss induce the accumulation of PI3P, in muscle cells of *MTM1*-KO mice models. However, the molecular and physiopathological consequences of MTM1 substrates deregulation are unknown. Previous observations show an altered anabolism-catabolism balance in muscle cells depleted of MTM1 expression. In particular, the two major pathways of cellular degradation: UPS (ubiquitin proteasome system) and autophagy are deregulated in this model. A direct role of MTM1 in UPS component regulation has been proposed while its role in anabolism remains to be explored. In this context, the exploration of the major pathways of anabolism by a pharmacological screen on *Mtm1*-KO muscle cells has enabled my team to highlight a hyperactivation of the mTORC1 pathway (mammalian Target Rapamycin complex 1). It's a major complex that regulates cell growth and inhibits cell degradation by repressing autophagy. The team confirmed the overactivation of mTORC1 pathway in differentiated muscle cells (from mice and patients). Interestingly, the pharmacological inhibition of this pathway has certain benefits on the differentiation of myotubes but also on muscle function, and survival of *Mtm1*-KO mice. Based on these findings, my thesis project aimed to determine the molecular link between *Mtm1*, these lipid substrates, and mTORC1. Thus we explored the key organelle of recruitment and activation of mTORC1, the lysosome, and we hypothesized that *Mtm1* and its substrates act on the assembly of mTORC1 on this cellular compartment. The use of models of XLCNM supported by proteomics, metabolomics and lipidomics strategies at the lysosome scale allowed us to highlight a molecular link between PI3P and PI(3,5)P₂ and the subcomplex RAGULATOR(LAMTOR)-RagGTPase ; the axis of mTORC1 activation by amino acids. We have shown that the accumulation of PI3P and PI(3,5)P₂ on the lysosome promotes the formation and stability of LAMTOR-RagGTPase complex and thus predisposes mTORC1 to permanent activation. Thus, a regulated level of PI3P and PI(3,5)P₂ would serve as a platform for LAMTOR-RagGTPase complex to allow activation of mTORC1 independently of nutrient fluxes. Nevertheless, an accumulation of these lipids induces an overactivation of mTORC1 with harmful repercussions on muscle differentiation and function. Finally, our study proposes the use of mTORC1 inhibitors as an interesting therapeutic tool against this myopathy which to date remains incurable.

Table des matières

Remerciement	1
Résumé.....	3
Abstract.....	5
Abréviation	10
Index des figures	14
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
Chapitre 1. Phosphoinositides (PI) : Les PI-3-phosphates et leur métabolisme.....	18
1.1 Les phosphoinositides (PI) : généralité, localisation et interaction.	18
1.1.1 Composition et métabolisme.....	18
1.1.2 Localisation des PIs	22
1.1.3 Interaction protéines-PIs.	23
1.2. Les rôles des PIs : dynamique des membranes et des endosomes.....	24
1.2.1 Le trafic des endosomes : l'endocytose	25
1.2.2 Le tri des cargos endocytés	25
1.3. Le système de dégradation et les PIs.	28
1.3.1 Les voies de dégradation.....	28
1.3.2 L'autophagie et le rôle du PI3P dans la formation des autophagosomes	30
1.3.3 Le lysosome et le PI(3,5)P ₂	32
Chapitre 2. Les myotubularines et la myopathie centronucléaire lié à l'X.....	42
2.1. Famille et structure des myotubularines.	42
2.1.1 Biochimie et enzymologie des MTMs.....	42
2.1.2 Localisation des MTMs	44
2.1.3 Myotubularines et pathologies	45
2.2. La myopathie centronucléaire lié à l'X.....	45
2.2.1 Les mutations	45

2.2.2 La myopathie centronucléaire lié à l’X : Description clinique, diagnostic et étiologie.....	46
2.3. Le muscle squelettique sain vs l’XLCNM.....	47
2.3.1 Le muscle sain : développement et organisation.	48
2.3.2 Caractéristiques du muscle squelettique des patients XLCNM.....	53
2.4. Rôle de MTM1 dans le muscle : étude de l’XLCNM.....	54
2.4.1 Hypothèse de l’arrêt de maturation.....	55
2.4.2 Le rôle dans la transduction du signal.....	56
2.4.3 Le rôle dans le recyclage et le remodelage membranaire	59
2.4.4 Le rôle dans la dégradation	59
2.5. Thérapie.	62
2.5.1 La thérapie génique.....	62
2.5.2 Normalisation des niveaux de MTM1	63
2.5.3 Autres stratégies.....	63
Chapitre 3. mTORC1 et les PIs: lien dans la myopathie centronucléaire lié à l’X.....	65
3.1 L’architecture de mTOR.	66
3.2 Les fonctions de mTORC1.	68
3.2.1 La production de protéines et de biomasse.	68
3.2.2 La répression du catabolisme et de l’autophagie.	70
3.3 Régulation de mTORC1.	71
3.3.1 Les facteurs de croissance.....	72
3.3.2 Les acides aminés et autres nutriments.....	73
3.3.3 L’énergie, l’oxygène, le stress et la localisation.	76
3.4 La régulation de mTORC1 par les phosphoinositides et Mtm1.	78
3.4.1 Implication du PI3P.	78
3.4.2 Implication du PI(3,5)P ₂	79
3.4.3 Implication d'autres PI	80

3.4.4 Implication de Mtm1 : rôle de mTORC1 dans l'XLCNM	81
OBJECTIF DE THESE.....	83
ARTICLE.....	87
DISCUSSION.....	139
BIBLIOGRAPHIE.....	151
ANNEXE	177
ARTICLE 1.....	178
ARTICLE 2.....	186
C.V.....	220

Abréviation

-	
4E-BP1	4E-bonding protein
A	
AAV	Adeno associated virus
ADCNM	Autosomique dominante form of centronuclear myopathy
AMPK	AMP-activated protein kinase
ARCNM	Autosomique recessive form of centronuclear myopathy
ATF4	Activating transcription factor 4
Atg	Autophagy related protein
C	
CC	Coiled-coil
CNM	Centronuclear myopathy
CASTOR1	Cellular arginine sensor for mTORC1
D	
DAG	Diacyglycérol
DFCP1	Double-FYVE-domain-containing-protein-1
DSP	Dual specificity phosphatase
D3-PI	Phosphoinositides phosphorylé en position 3
DNM2	Dynamine 2
Deptor	DEP somain containg mTOR interracting protein

E	
EEA1	Early endosome antigen 1
EGFR	Endotheliale Growth factor receptor
ESCRT	Endosomal Sorting Complex requiert for transport
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor
F	
FLCN-FNIP	Folliculin-Folliculin interacting protein
FYCE-CENT	Fyve domain-containg centrosomal protein
FYCO1	FYVE and coiled-coil domain autophagy adaptator 1
FYVE	Fab1-YOTB-Vac1-EEA1
G	
GAP	GTPase activating protein
GATOR 1/2	GAP activity toward Rags 1/2
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanosine exenche factor
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GTP-ase	Guanosine TriPhosphat-ase
H	
HRS	Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate
HSA	Human skeletal actin promoter

I	
IEC	Intestinal epithelium cells
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
INPP4 A/B	Inositol Polyphosphate-4-Phosphatase type 1 A/B
INPP5E	Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase E
IP3	Inositol triphosphate
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
K	
	Intermediate conductance
KCNN4	calcium-activate potassium channel protein 4
L	
LC3	Microtubule-associated protein 2 1 A/B-light chain 3
LSD	Lysosomal storage disorder
LRS	Leucyl-tRAN synthetase
LYCHOS	Lysosomal cholesterol signaling
M	
mLST8	Mammalian lethal with SEC13 protein 8
MOSPD2	Motile sperm protein domain-containing 2
MRF	Facteurs de transcription myogénique
mSIN1	MAPK-interacting protein 1
MTM	Myotubularine
mTORC1/2	Mechanistic/mammalian target of rapamycine complexe 1/2
MYL1	Myosine light chain 1

MyoG	Myogénine
N	
NMJ	Neuromuscular jonction
O	
ORP1	Oxyterol-binding protein homologue 1
P	
PA	Acide phosphatidique
PAS	PIKFyve/ArPIKFyve/SAC3 complex
PDZB	PDZ-bonding
PE	phosphatidyléthanamine
PGDF	Platelet-derived growth factor
pH	Potentiel hydrogen
PH	Pleckstrin Homology
PH-GRAM	Pleckstrin homology-glycosyltransferase Rab-like
PI	Phosphoinositide
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PI4P	Phosphatidylinositol-4-phosphate
PI5P	Phosphatidylinositol-5-phosphate
PI(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate
PI(3,5)P ₂	Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

PIP3 ou PI(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol-3,4,5- triphosphate
PI/K	phosphoinositide (i)-ki- nases ; i = 3 ; 4 ; 5
PIKFyve	Phosphoinositide kinase FYVe-Type zinc finger containing
PK C/N	Protein kinase C/N
PRAS40	Prolin rich Akt substrate 40kDa
Protor 1/2	Protein associated with Ric- tor 1/2
PtdIns	Phosphatidylinositol
PTEN	Phosphatase and Tensin homologue deleted on chro- mosome 10
PTP	Protein tyrosine phosphatase
PX	Phox homology
R	
RyR 1/2	Ryanodine receptor 1/2
RID	Rac-induced recruitment
Raptor	Regulatory associated pro- tein of mTOR
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RE	Reticulum endoplasmique
RS	Reticulum Sarcoplasmique
ROS	Reactive oxygene species
S	
S6K	P70 S6 kinase
SAMTOR	S-adenosylmethionine sen- sor for mTORC1

SHIP1/2	SH2 containing inositol 5'- phosphatase 1/2
SID	Set-interacting
SLC38A9	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 9
SNARE	Soluble N-ethylmeleimide sensitive factor attachement membrane
SNX3/9	Sorting Nexin 3/9
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
START	Steroidogenic acute regula- tory protein related lipid transfert
T	
TFAM	Transcription factor A mi- tochondriale
TFEB	Transcription factor EB
TIF-1A	Transcription initaition fac- tor
TNF	Tumor necrosis factor
TPC 1/2	Two pore channel 1/2
TRPML1	Transient Receptor poten- tial mucolipin 1
TSC	Tuberous sclerosis complex
TTN	Titin
U	
UBF	Upstream binding factor
UBQLN2	Ubiquiline 2
ULK1	Unc-51-like autophagy acti- vating kinase 1
UVRAG	UV radiation resistance as- sociated gene

V	
v-ATPase	Vacuolar-ATPase
VAP A/B	VAMP associated protein A/B
Vps	Vacuolar protein sorting
W	

WIPI 1/2	WD40 repeat protein inter- actions with phosphoinosi- tide 1/2
X	
XLCNM	X-linked centronuclear myopathy

Index des figures

Figure 1 : Structure du phosphatidylinositol ou PtdIns, le précurseur des phosphoinositides.	18
Figure 2 : Cycle des phosphoinositides et enzymes intervenant dans leur régulation.....	21
Figure 3 : Schéma de la localisation des phosphoinositides dans la cellule.	22
Figure 4 : Schéma des domaines protéiques qui ont une affinité vis-à-vis des phosphoinositides.....	23
Figure 5 : Métabolisme du PI3P.	26
Figure 6 : Le tri des protéines endosomales.	27
Figure 7 : Le rôle du PI4P et du PI3P dans le recyclage.	28
Figure 8 : Les différentes voies menant à la dégradation du matériel cellulaire.	29
Figure 9 : Déroulement de l'autophagie..	31
Figure 10 : Propriétés des lysosomes et régulation de sa biogenèse par TFEB.....	33
Figure 11 : Métabolisme du PI(3,5)P ₂	34
Figure 12 : Rôle du PI(3,5)P ₂ dans la fusion du lysosome via le recrutement de la cortactine.	36
Figure 13 : Stratégie de fusion et de fission du lysosome.	37
Figure 14 : Rôles du PI(3,5)P ₂ sur les canaux calcique lysosomal TCP1/2 et TRPLM1	38
Figure 15 : Biogenèse lysosomale via TFEB et le calcium.	39
Figure 16 : Rôles du PI(3,5)P ₂ sur les canaux et pompe lysosomal.	40
Figure 17 : Cartographie de MTM1 : la protéine et les mutations associées.....	43
Figure 18 : Mutations et organisation du gène Mtm1.....	46
Figure 19 : Développement du muscle squelettique : La myogénèse.	49
Figure 20 : Développement et organisation du muscle squelettique.	51
Figure 21 : Couplage excitation-contraction du muscle squelettique.....	52
Figure 22 : Coupe transversale d'une biopsie musculaire d'enfant contrôle (CTRL) comparée à des patients XLCNM (XLCNM)..	53
Figure 23 : Rôle de Mtm1 dans la fonction musuclaire.....	58
Figure 24 : La voie mTORC1.....	66
Figure 25 - Structure de mTORC1 et mTORC2 (d'après Sabatini et al, 2020).....	68
Figure 26 - Production de protéines et de biomass (lipide, nucléotides) par mTORC1.	70
Figure 27 - Répression de l'autophagie par mTORC1	71
Figure 28 - Régulation de mTORC1.....	71

Figure 29 - Activation de mTORC1 par les facteurs de croissance.....	73
Figure 30 – Le complexe Ragulator-RagGTPase.	74
Figure 31 - Régulation de mTORC1 par les acides aminés.....	76
Figure 32 - Rôles du PI3P dans l'activation de mTORC1.....	79
Figure 33 – Modèle théorique de l'activité de mTORC1 au cours de la différenciation musculaire.	142
Figure 34 – Modèle hypothétique de la fonction de MTM1 au niveau du RE/RS.	147

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Phosphoinositides (PI) : Les PI-3-phosphates et leur métabolisme.

1.1 Les phosphoinositides (PI) : généralité, localisation et interaction.

1.1.1 Composition et métabolisme

Les phosphoinositides (*PI*) forment une classe quantitativement mineure de phospholipides (10 à 15% des phospholipides totaux). Ils ont la capacité d'intervenir activement dans la signalisation cellulaire en fonction de leur état de phosphorylation.

Les PIs sont composés de deux acides gras fixés sur le squelette glycérol lui-même relié au noyau inositol par une liaison phosphodiester (**Figure 1**). Ces acides gras sont majoritairement l'acide stéarique (C18:0) fixé en position 1 et l'acide arachidonique (C20:4) fixé en position 2.

Les positions 3, 4 et 5 du noyau inositol peuvent être phosphorylées par des kinases spécifiques, permettant la génération de sept phosphoinositides différents, classés selon la position et le nombre de groupements phosphate portés par le noyau inositol.

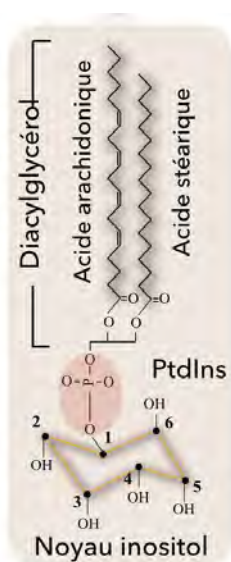


Figure 1 : Structure du phosphatidylinositol ou PtdIns, le précurseur des phosphoinositides (Viaud et al, 2015).

Le phosphatidylinositol (PtdIns) qui ne possède pas de phosphorylation est le précurseur des sept autres formes ainsi que le PIs le plus abondant.

- Les PIs monophosphorylés, au nombre de trois : Le PI3P (*Phosphatidylinositol-3-phosphate*) ; Le PI4P (*Phosphatidylinositol-4-phosphate*) et le PI5P (*Phosphatidylinositol-5-phosphate*).
- Les PIs biphosphorylés : Le PI(3,4)P₂ (*Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate*) ; le PI(3,5)P₂ (*Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate*) ainsi que le PI(4,5)P₂ (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*).
- Enfin un PI trisphosphorylé le PI(3,4,5)P₃ ou PIP₃ (*Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*).

Dans la cellule, le PtdIns est l'inositol lipide le plus abondant (80% des PI totaux et 5 à 8% des phospholipides totaux). Ensuite, le PI4P et le PI(4,5)P₂ sont les deux PI les plus présents dans la cellule, ils atteignent chacun un peu moins de 10% de PI totaux (et 1 à 3% des phospholipides totaux). Chaque autre PI représente, individuellement, au maximum 1% des PI totaux (et l'ensemble compte pour 2% des phospholipides).

Historiquement, c'est en 1949 que les premières investigations sur les PIs commencent. En effet, Folch en 1948 et Folch et LeBaron en 1953 révèlent la présence de deux formes de lipide lié à l'inositol dans le cerveau de rat qu'ils appelèrent : diphosphoinositide (Folch, 1948; Folch & LeBaron, 1953). A partir de 1959 la communauté scientifique élargit les connaissances et découvre toute l'hétérogénéité de ces petits lipides. Ainsi, nous avons la description de lipide monophosphorylé (le PtdIns et le PI4P) ; biphosphorylé (le PI(4,5)P₂) et même triphosphorylé (PIP₃) dès 1961. La découverte de l'activité enzymatique qui induit la phosphorylation du noyau inositol sur la position 3-OH (D3) a démarré fin des années 70s début des années 80s. Un premier travail montre que la protéine tyrosine kinase d'un virus a une activité phosphatidylinositol kinase et impacte fortement les taux du PI4P et de PI(4,5)P₂ (Macara et al., 1984). D'autres stimuli ont ensuite montré la même augmentation des taux de ces PI tels que d'autres virus mais aussi une stimulation par le PGDF (*platelet-derived growth factor*) (Whitman et al., 1985). L'étude de Kaplan et de ses collaborateurs en 1987 met en évidence une phosphoprotéine de 85 kDa qui serait impliquée dans cette activité kinase (Kaplan et al., 1987). Un an plus tard les produits de cette réaction sont étudiés et mettent en évidence la fabrication de deux nouveaux PI, la réaction du PI4P avec cette phosphoprotéine donne du PI(3,4)P₂ et si le substrat est du PI(4,5)P₂ on obtient du PI(3,4,5)P₃/PIP₃ (Whitman et al., 1988). Peu après, en 1989 l'existence du PI3P sera découverte (Stephens et al., 1989). Ce sont les premières observations de l'existence de PI3-kinase, ces découvertes ont amorcé l'étude d'un réseau de conversion des PI par de nombreuses kinases.

En parallèle, les premières activités phosphatases sur les PIs sont aussi étudiées. En effet, un an après la découverte du PI3P, il est découvert dans un homogénat de cellules NIH3T3 une protéine qui hydrolyse le PI3P (Lips et al., 1989). C'est dix ans plus tard que la protéine est clonée et permet d'identifier les Myotubularines, une famille de PI3-phosphatases composée de 14 membres (Nandurkar et al., 2001). Sur plusieurs années c'est tout un réseau de PI-phosphatases et de PI-kinases qui est étudié mettant à jour une régulation fine et rapide des PIs présents dans la cellule (**Figure 2**).

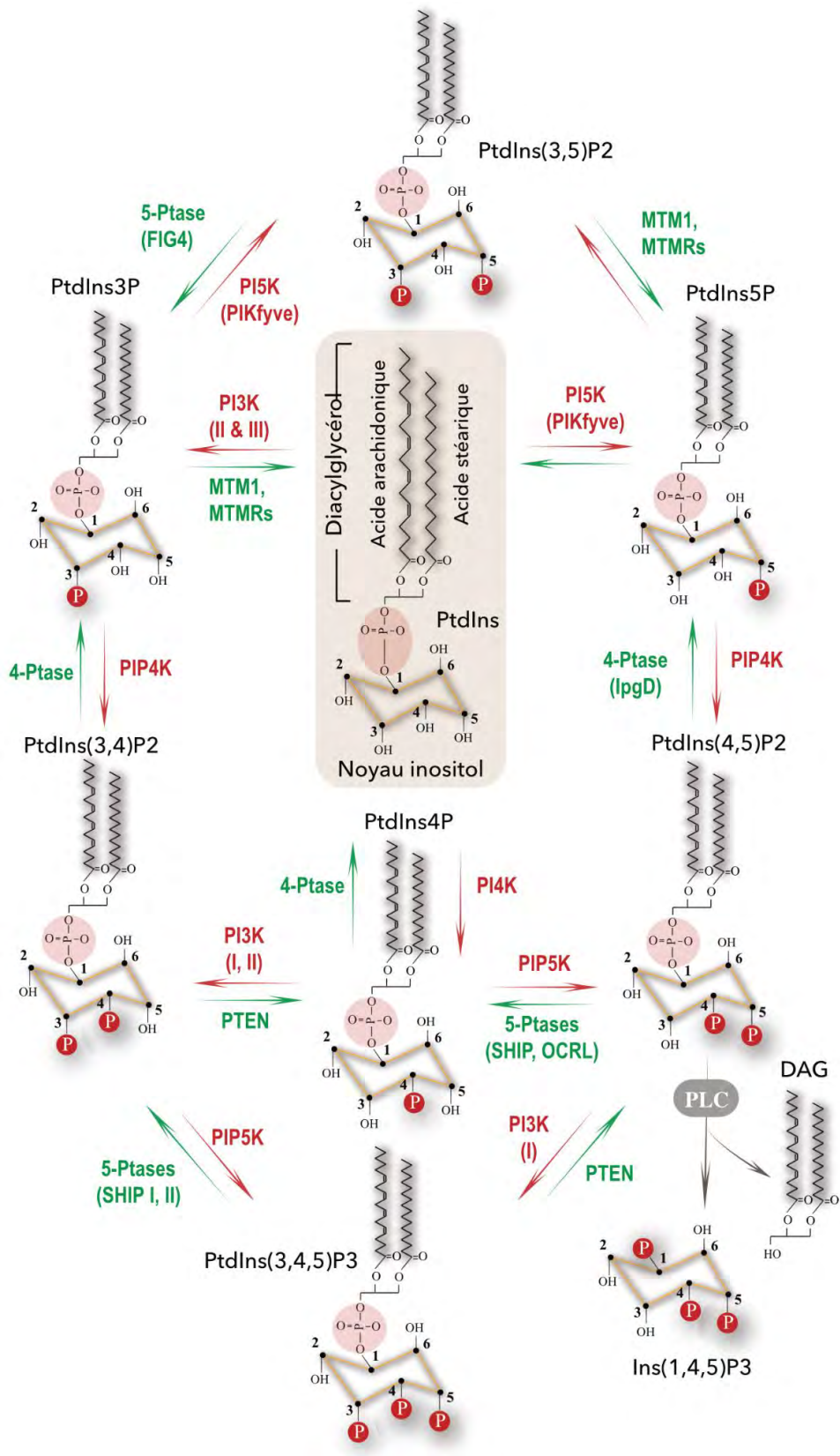


Figure 2 : Cycle des phosphoinositides et enzymes intervenant dans leur régulation (d'après Viaud et al, 2016).

1.1.2 Localisation des PIs

Le métabolisme des PIs est extrêmement actif et finement régulé par toutes ces PI-kinases et phosphatases. Elles permettent la génération rapide et plus ou moins transitoire de territoires membranaires enrichis ou appauvris en certains PIs. Les PIs sont insérés dans les membranes via leurs chaînes d'acide gras et le noyau inositol fait face au cytosol, le rendant ainsi accessible aux PI-kinases et phosphatases mais également à différents partenaires protéiques encore appelés effecteurs. Les PIs sont ainsi répartis dans tous les compartiments cellulaires type organelle (De Craene et al., 2017; Hasegawa et al., 2017; Viaud et al., 2016). Cette localisation différentielle des PIs donne une identité membranaire particulière aux compartiments cellulaires. Cependant des études plus récentes suggèrent l'existence de PIs dans des compartiments non-membranaires tels que les compartiments chromatiniens.

Concernant la répartition cellulaire des PIs, globalement les observations dans la littérature s'accordent à localiser le $PI(4,5)P_2$ majoritairement à la membrane plasmique ; le $PI4P$ au niveau de l'appareil de Golgi ; le $PI3P$ au niveau des membranes des endosomes précoces ; le $PI(3,5)P_2$ dans les membranes des endosomes tardifs et des lysosomes ; et enfin le PIP_3 et le $PI(3,4)P_2$ à la membrane plasmique (**Figure 3**).

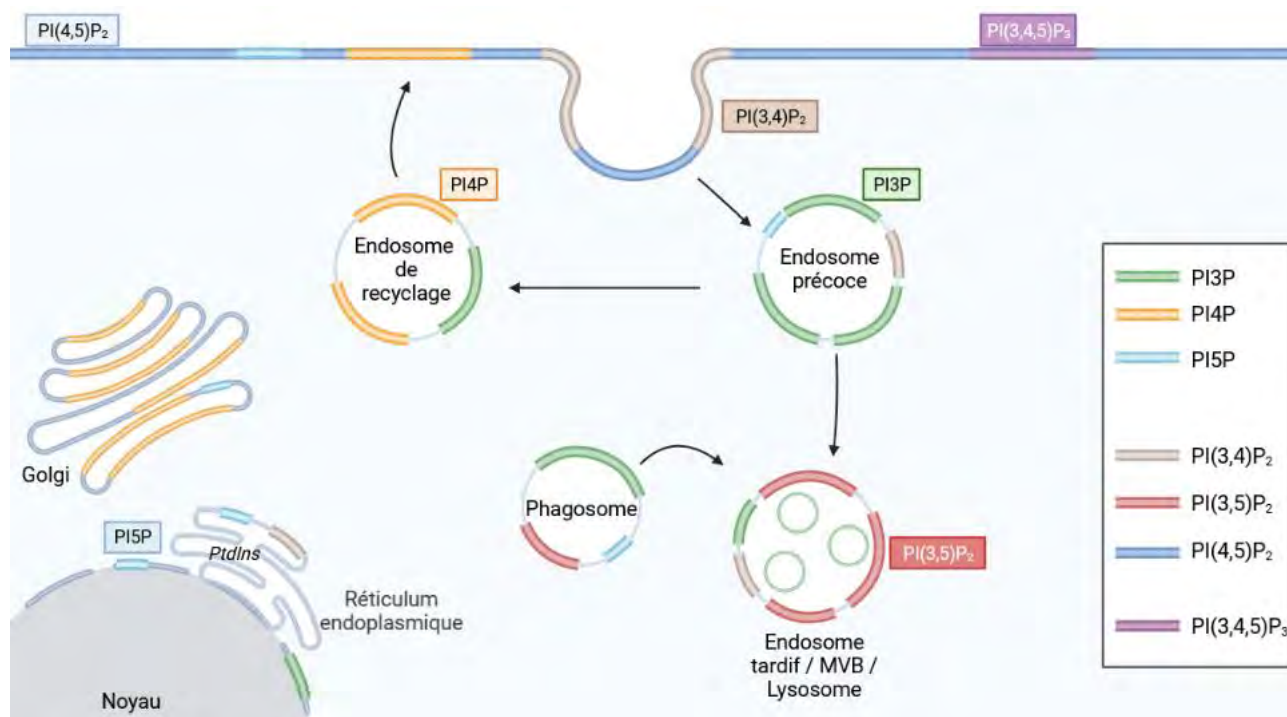


Figure 3 : Schéma de la localisation des phosphoinositides dans la cellule.

1.1.3 Interaction protéines-PIs.

Même minoritaires dans le pool des lipides cellulaires, les PIs jouent le rôle de second messenger important et sont capables d'interagir avec des domaines et motifs protéiques et de ce fait de déclencher des signaux et cascades moléculaires orchestrant l'homéostasie cellulaire. Pour cela ces protéines sont pourvues de domaines d'interactions spécifiques qui leur permettent de lier ces lipides tels que le domaine PH (*Pleckstrin Homology*), le domaine PX (*Phox Homology*), le domaine FYVE (*Fab1-YOTB-Vac1-EEA1*), et de nombreux autres. Par exemple, le PI3P est reconnu par les domaines FYVE, PH et PX, le PI(3,4)P₂ par des domaines PH et PX alors que le PI(3,5)P₂ est reconnu par les domaines PH, PROPPINS et WD40 (**Figure 4**).

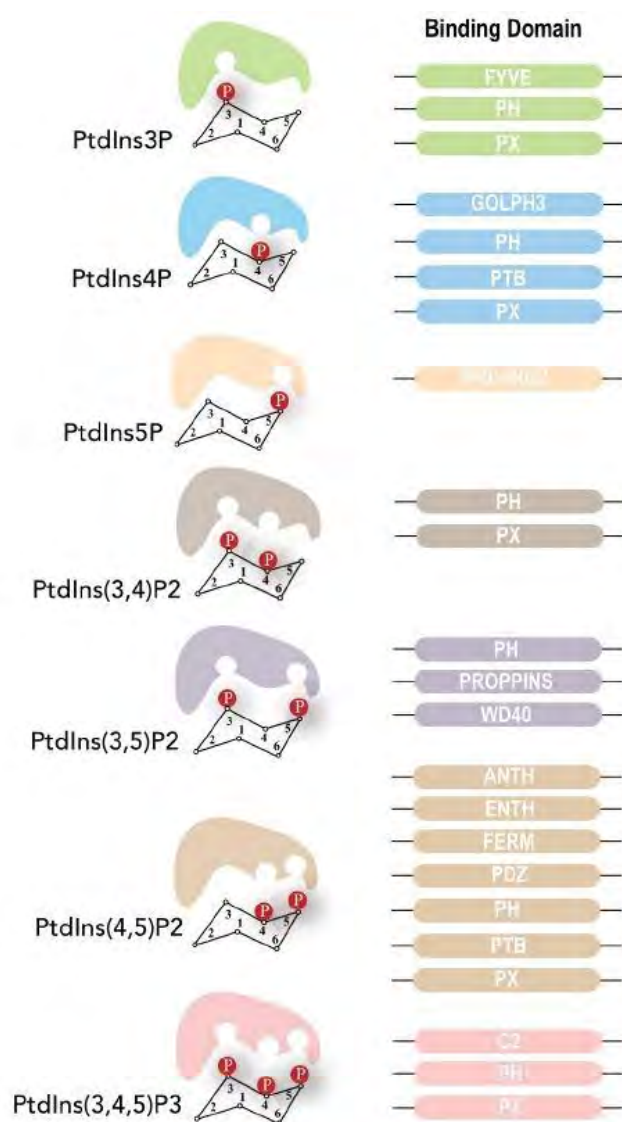


Figure 4 : Schéma des domaines protéiques qui ont une affinité vis-à-vis des phosphoinositides. Certains de ces domaines sont utilisés comme sonde (avec plus ou moins de succès) pour localiser les PIs. C'est le cas par exemple des domaines FYVE utilisés pour détecter le PI3P.

Le domaine PH, par exemple, se compose d'environ 120 acides aminés et se retrouve dans plus de deux cent cinquante protéines de la signalisation qui peuvent aussi bien être des protéines kinases, des facteurs d'échange, des protéines activatrices, des GTPases (*Guanosine triphosphatases*), des phospholipases ou encore des protéines adaptatrices.

Récemment de nouvelles études permettent de redéfinir les interactions entre PIs et protéines. Il faut noter que les PI sont des lipides négativement chargés, il est spéculé que la présentation à la membrane de cette charge négative pourrait permettre des interactions avec des acides aminés chargés positivement. Ainsi, récemment il a été montré qu'une protéine avec des motifs polybasiques simples et non organisés en motif peuvent établir des interactions spécifiques avec les Pis, par exemple, l'organisation en trois dimensions d'acides aminés basiques au sein d'un complexe protéique peut donner lieu à une interaction avec les PI (Fitzian et al., 2021). Le rôle principal des PIs est le recrutement de protéines intervenant dans de nombreux processus. Fondamentalement les PIs forment des plateformes de recrutement sur les différentes membranes de la cellule. De ce fait les interactions liées à la propriété électrostatique et non plus seulement aux domaines protéiques ouvrent encore plus le champ des possibles pour ces petits lipides.

Dans la suite de ma présentation, il m'est impossible de présenter tous les rôles des PIs. Je présenterai donc leurs rôles les plus connus et m'appliquerai plus en détails sur le rôle du PI3P et du PI(3,5)P₂ qui sont les objets de mon étude.

1.2. Les rôles des PIs : dynamique des membranes et des endosomes

La régulation de la dynamique de la cellule repose sur le recrutement de protéines ou de complexes protéiques à des compartiments spécifiques de la cellule à des moments spécifiques (régulation spatiotemporelle). A travers le recrutement des protéines, les PIs ont de nombreux rôles dans la dynamique des membranes (endocytose, exocytose), dans le trafic des vésicules (tri endosomal, maturation des vésicules, recyclage), mais aussi dans l'autophagie et la dynamique lysosomale (Posor et al., 2022).

D'un point de vue très schématique, le PI4P est enrichi au Golgi et le PI(4,5)P₂ à la membrane plasmique. Ces deux PI sont plutôt impliqués dans les phénomènes liés à la voie sécrétoire des protéines trans-Golgi : de leur synthèse dans le RE vers leur passage dans le Golgi jusqu'à leur exocytose ou leur distribution dans les différents compartiments.

A contrario le système endosomal est plutôt riche en PI3P et en PI(3,5)P₂. Ces deux espèces sont plutôt impliquées dans l'identité des endosomes précoces, le tri des cargos vers la voie de dégradation et la régulation de la voie de dégradation (lysosomale et autophagosomale).

1.2.1 Le trafic des endosomes : l'endocytose

Il existe de nombreuses voies d'endocytose, la mieux caractérisée et la plus utilisée par la cellule pour l'internalisation de récepteur est l'endocytose médiée par la clathrine. Le PI(4,5)P₂, très enrichi à la membrane plasmique, est responsable des premières étapes de l'endocytose. Cependant au cours du processus ce PI est graduellement transformé pour acquérir une phosphorylation en position 3'(OH), qui est caractéristique du système endosomal. De nombreuses protéines s'associent avec le PI(4,5)P₂, comme l'adaptateur à la clathrine AP2 ainsi que de nombreux adaptateurs de cargos (Posor et al., 2015).

Au fur et à mesure, le manteau de PI(4,5)P₂ entourant les vésicules naissantes d'endocytose est déplété et transformé en PI(3,4)P₂. Les enzymes impliquées sont dans un premier temps des PI-5-phosphatases telles que la synaptojanin 1 p170 (Perera et al., 2006) et SHIP2 (*SH2 domain containing inositol 5'-phosphatase 2*) (Nakatsu et al., 2010). Elles transforment le PI(4,5)P₂ en PI4P. Puis la PI3KC2α forme du PI(3,4)P₂ à partir du PI4P (Lo et al., 2022). Le PI(3,4)P₂ promeut la constriction finale des vésicules de clathrine en liant la protéine SNX9 (*Sorting Nexin 9*) via son domaine PX et permettant son recrutement à la membrane plasmique. Une fois activée, SNX9 est responsable de la constriction de la membrane grâce à son domaine BAR (Schöneberg et al., 2017).

Il existe d'autres processus d'endocytose qui répondent à des demandes spécifiques de certains tissus ou à des contextes particuliers. Par exemple l'endocytose rapide médiée par l'endophilin. Les protéines impliquées ne sont pas la clathrine et ses adaptateurs mais la lamelliopdin et l'endophilin (Boucrot et al., 2015). Cependant, le système de conversion des PIs reste le même.

Dans tous les cas la conversion finale est la transformation du PI(3,4)P₂ en PI3P par la 4-phosphatase INPP4A et INPP4B (*Inositol Polyphosphate-4-phosphatase type IA/B*) (H.-W. Shin et al., 2005), après la scission de la vésicule et la formation de l'endosome précoce (H. Wang et al., 2020).

1.2.2 Le tri des cargos endocytés

Dans les endosomes précoces, un tri des protéines est effectué entre celles qui seront recyclées vers la membrane plasmique, celles qui suivront le trafic rétrograde vers le trans-

Golgi et enfin celles qui seront envoyées vers le lysosome pour dégradation. Le PI3P est retrouvé majoritairement sur la membrane des endosomes précoces (**Figure 3**) mais aussi, minoritairement, sur les membranes des endosomes plus tardifs, l'autophagosome et même le lysosome. Le PI3P recrute de nombreux effecteurs via les domaines FYVE, PX ou PH. Ce PI est majoritairement produit par la PI-kinase de classe III Vps34/VpS15, un complexe formé de quatre sous-unités : Vps34, Vps15 (ou p150), Vps30 (ou Beclin-1) et Vps38 (ou UVRAG). Il peut aussi être métabolisé en PI(3,5)P₂ par PIKFyve. A noter qu'une minorité de ce PI3P est formée grâce aux PI3K de classe 2 (PI3KC2 α , β et γ) (Viaud et al., 2016) (**Figure 5**).

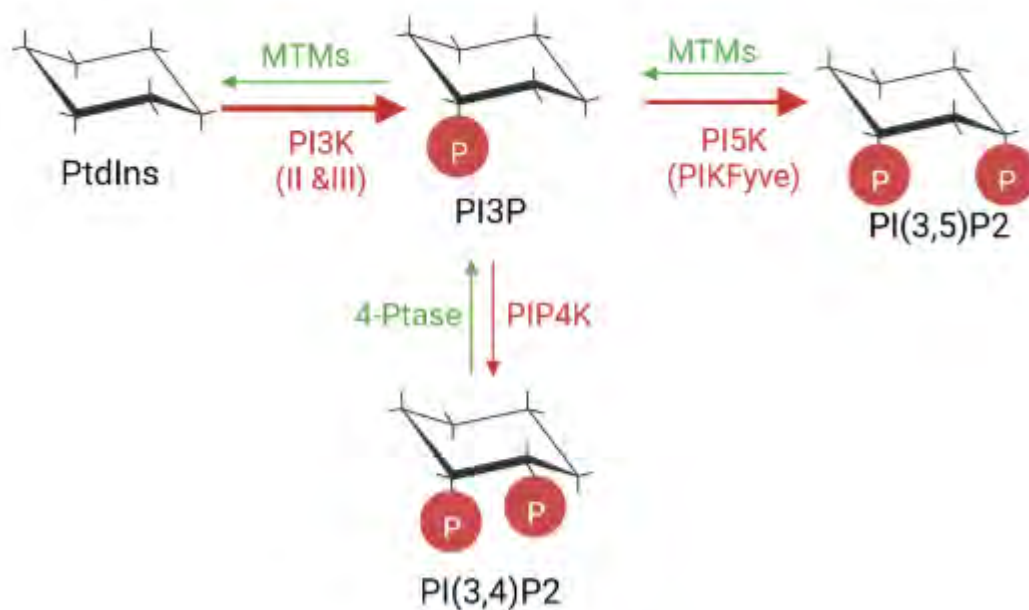


Figure 5 : Métabolisme du PI3P.

La maturation et le tri des cargos vers la dégradation

Rab5, une GTPase clé dans l'internalisation des récepteurs membranaires et la biogenèse de l'endosome permet l'activation de Vps34 via une interaction avec Vps15 (la sous-unité régulatrice du complexe PI3-kinase de classe III). Ceci permet l'augmentation de la synthèse du PI3P. Ce PI3P permet ensuite le recrutement d'autres effecteurs comme EEA1 (*Early endosomes antigen 1*) qui permet la maturation et le tri des protéines des endosomes. Cette étape s'accompagne par le recrutement d'autres protéines impliquées dans l'endocytose, comme la protéine HRS (*Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) via une interaction de son domaine FYVE avec le PI3P. HRS interagit avec des éléments, tels que ESCRT (*Endosomal sorting complex required for transport*), qui séquestrent les protéines membranaires ubiquitinylées, ce qui permet de guider les protéines vers la dégradation par les

lysosomes (Schink et al., 2013; Viaud et al., 2016). Il a été montré que MTM1 pourrait lier Vps34 et permettre ainsi la déphosphorylation du PI3P (C. Cao et al., 2007), afin de contrôler la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs moins riches en PI3P (Figure 6).

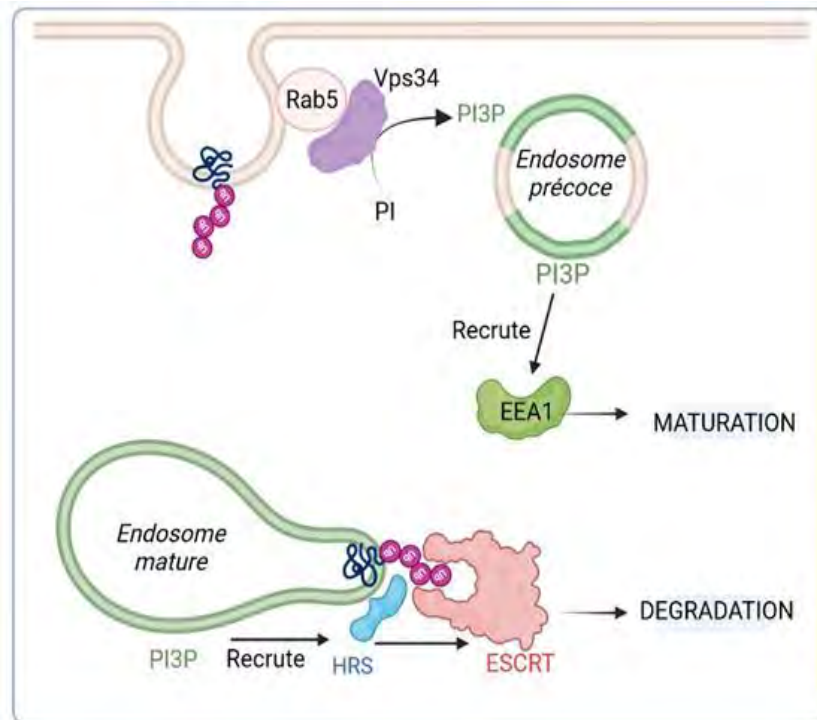


Figure 6 : Le tri des protéines endosomales. Le PI3P a un rôle dans la maturation des endosomes précoces via le recrutement de EEA1 ainsi que dans le tri des protéines via le recrutement de HRS qui à son tour recrute ESCRT une protéine qui en séquestrant les protéines membranaires ubiquitinylées les conduit vers leur dégradation dans le lysosome.

Le tri des cargos vers le recyclage

La phosphatase MTM1 et son substrat, le PI3P, interviennent aussi dans le recyclage des récepteurs internalisés à la membrane. En 2016, l'équipe de V. Haucke montre dans des myoblastes et des cellules HeLa que la déplétion de MTM1 provoque une diminution du récepteur de la transferrine à la membrane plasmique induisant ainsi l'accumulation de celui-ci dans le cytosol à proximité de la membrane plasmique. Cette étude propose un système de conversion en deux étapes du PI3P en PI4P qui fait intervenir MTM1 pour générer du PI, suivi de la conversion de ce PI par la PI4K2 α en PI4P (Ketel et al., 2016). En 2018, l'équipe de E. Hirsch a démontré grâce à l'utilisation d'une sonde FRET de Rab11 (une GTPase spécifique des compartiments de recyclages), que le PI3P sur les endosomes recrute Rab11 qui à son tour recrute MTM1 permettant l'hydrolyse du PI3P et ainsi active la PI4K2 α . Cette cascade va favoriser la synthèse du PI4P afin de permettre la fusion des vésicules cargo de recyclage à la membrane plasmique (Campa et al., 2018). Enfin, il a été montré que dans le modèle de C.

C. elegans un défaut d'expression de MTM1 est accompagné d'un défaut de recrutement de SNX3, une protéine qui se lie au PI3P et qui est essentielle pour le transport rétrograde des endosomes vers le Golgi (Xue et al., 2003). Le transport rétrograde est nécessaire pour le recyclage de certaines protéines membranaires intracellulaires ainsi que pour certains récepteurs (Schink et al., 2013; Silhankova et al., 2010; Viaud et al., 2016) (**Figure 7**).

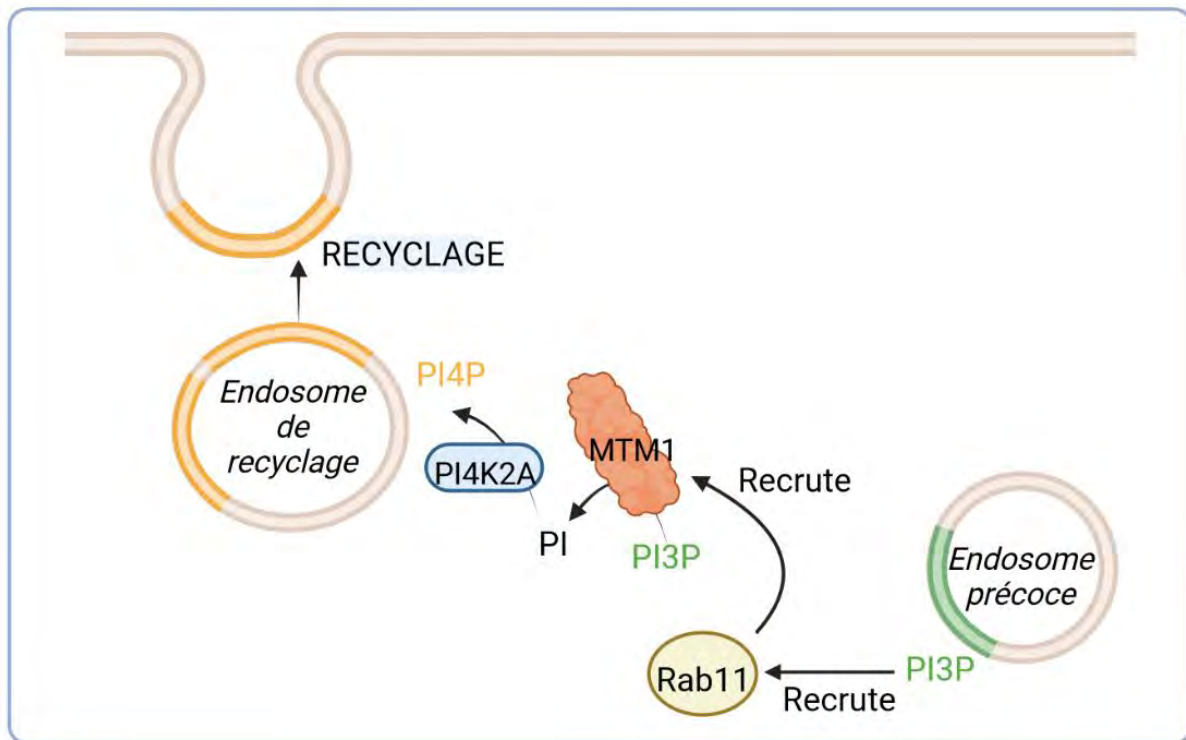


Figure 7 : Le rôle du PI4P et du PI3P dans le recyclage.

1.3. Le système de dégradation et les PIs.

1.3.1 Les voies de dégradation

Pour maintenir une fonction cellulaire optimale, la cellule a différentes voies de dégradation ou de recyclage des protéines. Les protéines membranaires peuvent être recyclées après l'endocytose. Elles sont envoyées dans des endosomes de recyclage qui en fusionnant avec la membrane plasmique permettent à ces protéines de redevenir fonctionnelles. Quand le recyclage n'est pas possible, les protéines doivent être dégradées pour recycler leurs composants et former de nouvelles protéines.

Les voies de dégradation présentes dans la cellule permettent de dégrader des protéines mal conformées, des agrégats et aussi des organites dysfonctionnels.

Une des voies majeures, que je ne détaillerai pas ici, est le système du **protéasome** qui permet la dégradation de protéines du RE et du cytosol suite à leur étiquetage par des ubiquitines. Les protéines membranaires devant être dégradées passent par la voie de

l'**endocytose** où elles sont triées et passent des endosomes précoces aux endosomes tardifs pour finalement être conduites dans le lysosome, site de dégradation. Enfin, l'**autophagie** est une voie permettant aussi bien la dégradation de protéines mal conformées des agrégats protéiques et des organites dysfonctionnels. A noter que certaines cellules dites phagocytaires tels que les neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques sont pourvues d'un autre système de dégradation appelé phagocytose, leur permettant d'intégrer et de dégrader des éléments extérieurs pouvant être des pathogènes (**Figure 8**).

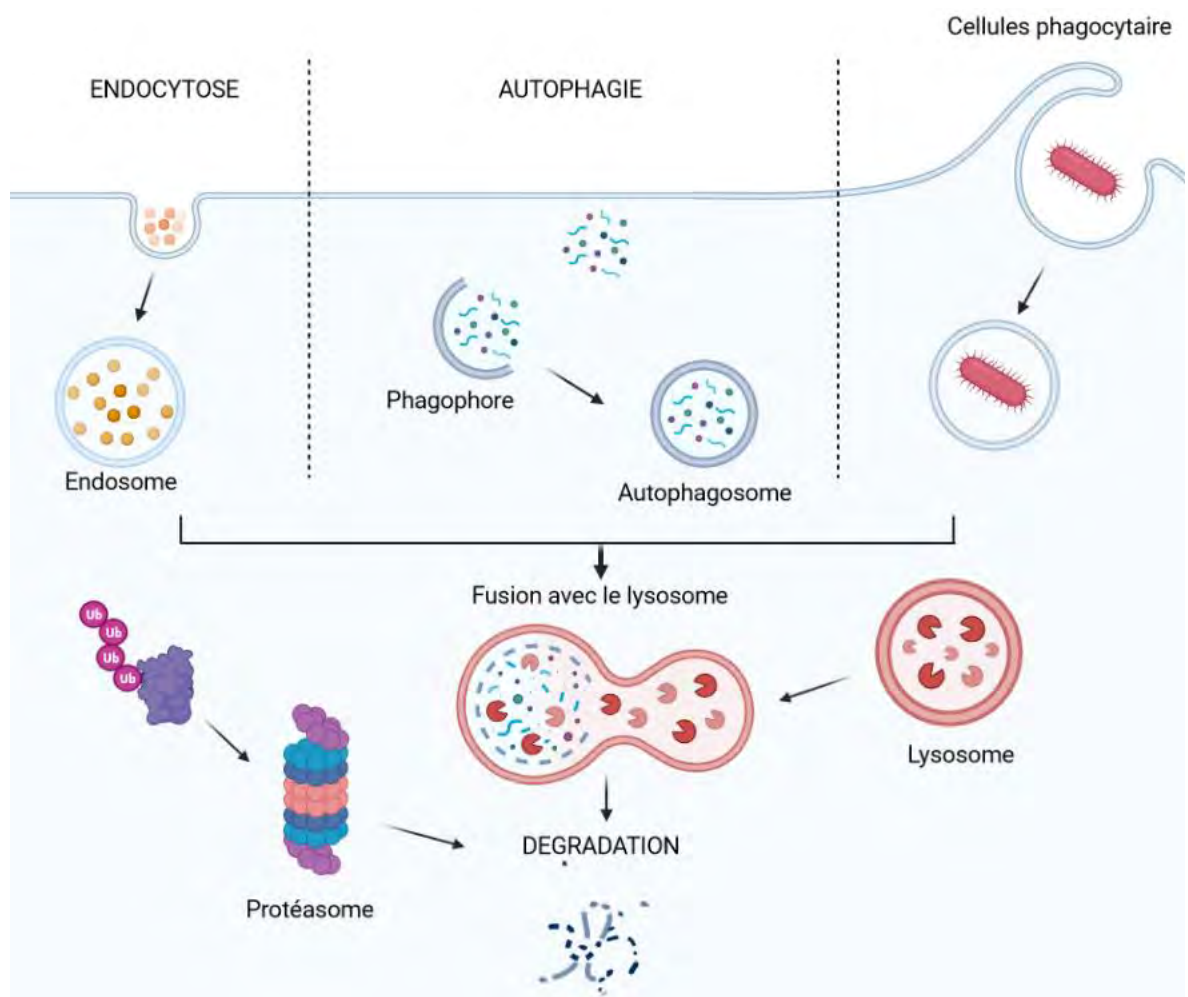


Figure 8 : Les différentes voies menant à la dégradation du matériel cellulaire. Les deux grandes voies sont l'ubiquitine-protéasome, un système de dégradation pour les protéines « anormale » du cytoplasme; ainsi que le lysosome, qui est le lieu final de dégradation pour les protéines de la membrane via l'endocytose, ou les débris cellulaires et organites défectueux via l'autophagie. Les cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles) ont une autre voie de dégradation leur permettant de digérer des particules extérieures telles que les pathogènes via phagocytose.

1.3.2 L'autophagie et le rôle du PI3P dans la formation des autophagosomes

L'autophagie est un processus physiologique qui peut s'illustrer sous la forme d'une « auto-digestion » de la part de la cellule. Elle assure un rôle de protection en dégradant le matériel cytoplasmique indésirable et permet le recyclage des protéines et organites. Ce mécanisme possède une activité basale lui permettant d'assurer le maintien du stock d'acides aminés et d'autres nutriments. Lors des périodes de carence ou d'autres stress métaboliques, l'autophagie est induite afin d'assurer la survie cellulaire et d'éviter l'apoptose. La macroautophagie, appelée communément autophagie, est caractérisée par l'encapsulation du matériel cytoplasmique à dégrader dans un système à double membranes originaire principalement du réticulum endoplasmique (RE) : l'autophagosome.

Lors d'une période de privation nutritionnelle, l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) est activée. Cette enzyme permet d'activer le complexe ULK1 (*Unc-51 Like autophagy activating Kinase*) soit de façon directe, soit de façon indirecte en inhibant mTORC1 (*mammalian/mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1*) (Egan et al., 2011). Une fois activé, le complexe ULK1 est recruté au niveau du site d'initiation de l'autophagie sur le RE. C'est la première étape de l'autophagie, appelée l'initiation. A son tour, ULK1 permet d'activer le complexe de nucléation phosphatidylinositol-3-kinase de classe III, constitué notamment de Vps34.

Ce complexe est nécessaire à la phase de nucléation qui consiste au bourgeonnement du RE formant ainsi une bicouche lipidique nommée phagophore ou pré-autophagosome. De par la fonction catalytique de Vps34, le PtdIns est phosphorylé en PI3P. Cette étape d'enrichissement en PI3P est essentielle car ce lipide membranaire permet le recrutement de protéines indispensables à l'élongation du phagophore telles que DFCP1 (*Double-FYVE-domain-containing-protein-1*) ou encore WIPI-1 et 2 (*WD40 repeat protein interactions with phosphoinositides 1 et 2*), appelé aussi Atg18 qui permet de recruter d'autres ATGs (*autophagy-related proteins*). Ces protéines s'organisent en complexe et possèdent une activité spécifique pour chaque étape du processus autophagique. Le dernier paramètre à prendre en compte dans l'élongation du phagophore est la mobilisation du LC3-I (*microtubule-associated protein 2 1A/1B-light chain 3*) (Kabeya et al., 2000). Cette protéine est recrutée et lipidée (liant le lipide PE (*phosphatidyléthanolamine*)) par des ATG formant ainsi du LC3-II, qui permet de faire le lien entre la membrane interne du phagophore et les différents cargos à dégrader (**Figure 9**).

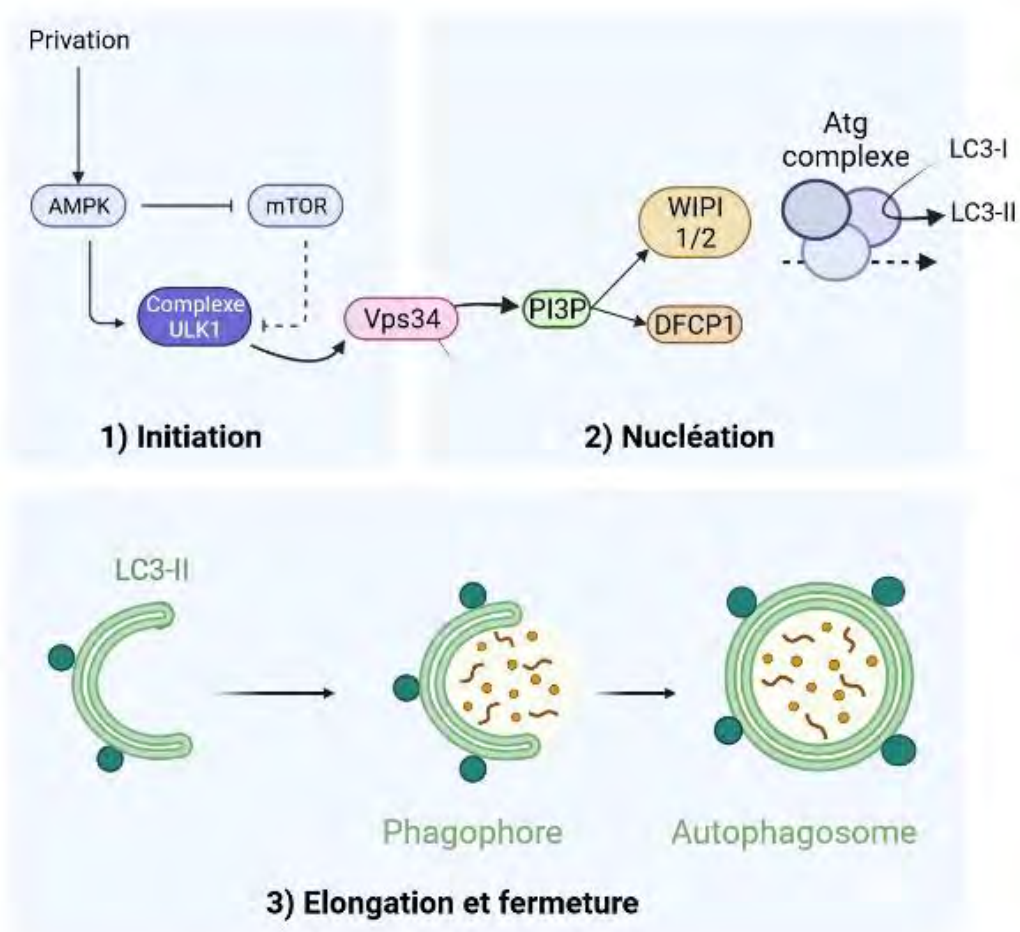


Figure 9 : Déroulement de l'autophagie. L'autophagie est initiée par l'activation du complexe ULK1 en cas de privation par exemple, ce complexe recrute le PI3-kinase de classe III qui produit du PI3P sur la membrane naissante du phagophore. Ce PI3P va recruter des protéines telles que WIPI-1 et 2 ou DFCP1. Ces protéines vont à leur tour recruter les protéines Atg : des régulateurs clé dans différentes étapes de l'autophagie notamment la délipidation de LC3 (LC3-II). Cette forme a un rôle clé dans l'élongation du phagophore et le recrutement du cargo.

1.3.3 Le lysosome et le PI(3,5)P₂

Le lysosome

Le lysosome est la destination finale de nombreuses protéines et autres constituants cellulaires pour leur dégradation. Au début des années 50, Christian Duve décrit le lysosome, une vésicule de 0.2 à 0.5 microns, identifiée comme un organite “poubelle”. Un organite responsable de la dégradation de macromolécules biologiques. Les déchets cellulaires arrivent par différentes voies dans le lysosome : la voie endocytique, la voie autophagique et la voie phagocytaire.

Cependant le dogme illustrant le lysosome comme un organite poubelle a changé depuis quelques décennies. Il est maintenant admis que toutes « les routes » de l’homéostasie cellulaire passent à un certain moment par le lysosome. C’est un hub de la fonction cellulaire qui s’adapte aux flux métaboliques, génère d’autres signaux métaboliques et intervient dans des fonctions multiples de la cellule. Cette dynamique est accompagnée par des changements de taille, de forme et de nombre grâce à des événements de fusion et fission et de biogenèse.

Ainsi on peut qualifier le lysosome comme une plateforme mobile et spatio-temporelle de signalisation (**Figure 10**) (Ballabio & Bonifacino, 2020). Ceci est illustré du fait de son implication directe dans plus d’une cinquantaine de maladies génétiques, appelées les maladies de surcharge lysosomale (*lysosomal storage disorder, LSD*) qui sont liées au dysfonctionnement de plusieurs enzymes de la machinerie lysosomale. De plus un dysfonctionnement du lysosome a été constaté dans de nombreuses maladies plus communes telles que les cancers, Parkinson ou l’obésité (Aits & Jäättelä, 2013; Perera et al., 2015; Sidransky et al., 2009).

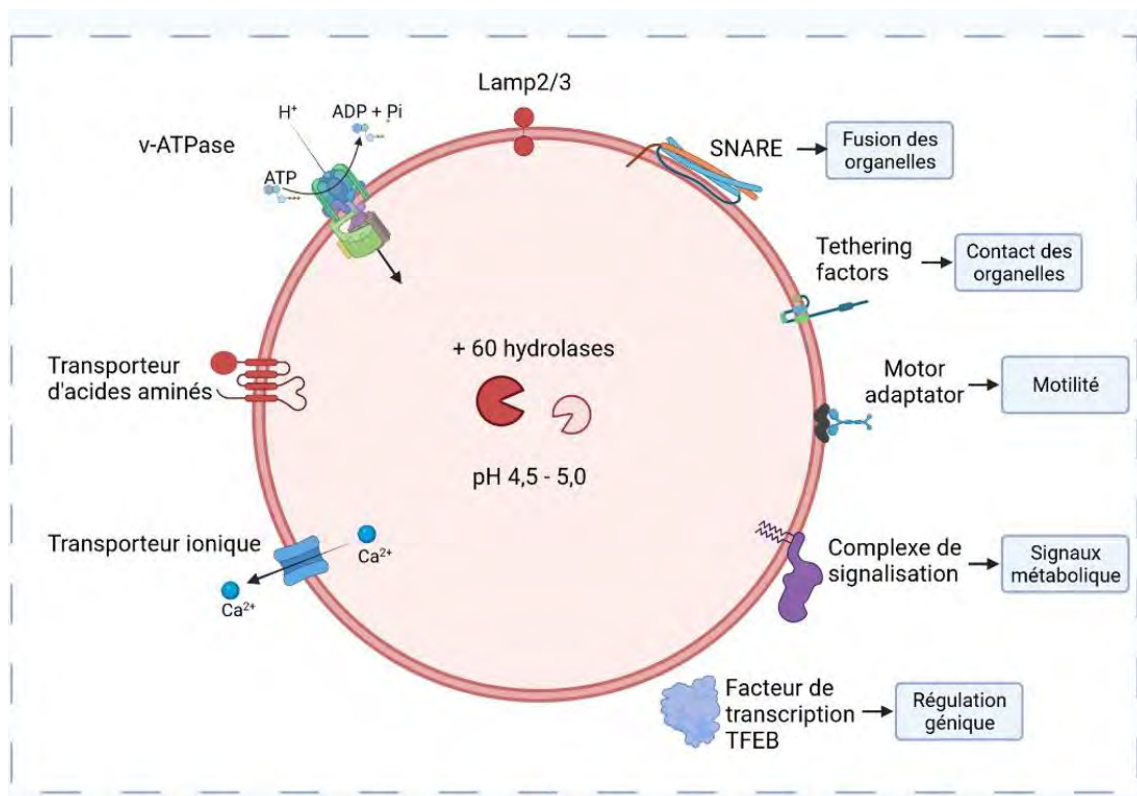


Figure 10 : Propriétés des lysosomes et régulation de sa biogenèse par TFEB. Le lysosome comporte de nombreuses protéines luminales et membranaires. Le lumen lysosomal contient des hydrolases acides lui permettant d'assurer ses fonctions de dégradation. Le pH acide est maintenu grâce à l'ATPase vacuolaire (v-ATPase). Les protéines membranaires associées au lysosome (LAMP) sont hautement glycosylées et servent notamment à protéger la membrane du lysosome contre la dégradation. La membrane lysosomale a aussi des canaux ioniques, des transporteurs pour le maintien de l'homéostasie ionique mais aussi pour le transport du cholestérol et autres lipides, l'exportation des sucres et des acides aminés. Les protéines SNARE permettent la fusion des lysosomes avec les autres organelles. Les lysosomes sont aussi des plateformes permettant l'association avec d'autres protéines et complexes protéiques tels que TFEB qui régule la biogenèse lysosomale. Les facteurs d'attache, eux, sont responsables de la fusion des lysosomes et des contacts avec d'autres organelles. Enfin les microtubules moteurs s'accrochent sur leur adaptateur pour permettre la motilité du lysosome (d'après Ballabio et al, 2020).

Les PIs retrouvés majoritairement sur le lysosome sont le PI(3,5)P₂ et le PI3P. Chez les mammifères, le PI(3,5)P₂ est généré majoritairement par la 5-kinase PIKFyve à partir du PI3P. PIKFyve fonctionne au sein d'un complexe de kinase/phosphatases, composé des éléments **PIKFyve**, **ArPIKFyve**, **SAC3** (appelé PAS). Ce complexe est relativement conservé au cours de l'évolution, chez la levure il est composé de **Fab1** (équivalent de PIKFyve), **Vac14** (équivalent de ArPIKFyve) et **Fig4** (équivalent de SAC3) auquel il est possible d'ajouter **Atg18** qui aurait un rôle dans la synthèse de PI(3,5)P₂. Ainsi le complexe PAS est capable de produire du PI(3,5)P₂ mais aussi du PI3P à partir de PI(3,5)P₂ grâce à l'activité 5-phosphatase de SAC3/Fig4, permettant d'assurer un turnover de ce lipide (**Figure 11**).

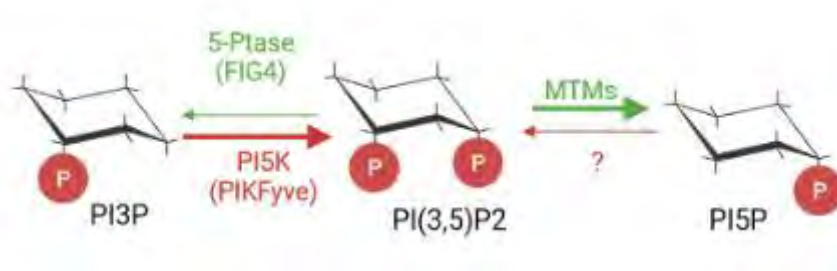


Figure 11 : Métabolisme du PI(3,5)P₂

Le PI(3,5)P₂ étant un PI très peu présent dans la cellule, sa localisation a été compliquée à déterminer. Les premières tentatives se sont basées, dans un premier temps sur la localisation des enzymes responsables de sa synthèse. Chez la levure Fab1, Fig4 et Vac14 ont été localisés à la membrane vacuolaire (équivalent du système endosomal mammifère) (Jin et al., 2008). Dans des cellules mammifères, les éléments de ce complexe ont été localisés sur la membrane des endosomes précoces, tardifs et celle du lysosome (Cabezas et al., 2006; Ikonov et al., 2006; Zolov et al., 2012).

Dans un deuxième temps, et suite à l'identification de protéines liants le PI(3,5)P₂, certaines études ont utilisé ces domaines et motifs comme des sondes afin de localiser le PI(3,5)P₂. La première sonde utilisée est la région N-terminal cytosolique de TRPML1 (*mucoipin transient receptor potential 1* ou *ML1N*; mSt-2xML1N) (Hasegawa et al., 2016; X. Li et al., 2013). En 2016, Takatori et ses collaborateurs utilisent le domaine WD40 de la protéine Atg18 (Takatori & Fujimoto, 2016) malgré le fait que cette sonde a une spécificité vis-à-vis du PI3P et du PI(3,5)P₂ (Obara et al., 2008). Pour déjouer l'interaction avec le PI3P les auteurs ont mis la sonde WD40 en compétition avec une sonde PX qui possède une plus grande affinité vis-à-vis du PI3P. Cette étude conclut que le PI(3,5)P₂ est localisé aux endosomes tardifs/lysosomes. En dépit de cette stratégie, les outils disponibles de détection PI(3,5)P₂ sont très limités et fonctionnent plus au moins en fonction du type cellulaire. Plus récemment des anticorps anti-phosphoinositides y compris un anticorps anti-PI(3,5)P₂ ont été mis sur le marché par la compagnie Echelon Bioscience et un nombre croissant d'études utilisent ces anticorps pour détecter les PIs. Dans notre étude nous avons choisi de tester et de comparer tous ces outils (sonde protéique disponible et anticorps) pour optimiser la localisation du PI(3,5)P₂ dans les cellules musculaires.

D'un point de vue physiologique l'importance du PI(3,5)P₂, a été démontrée notamment grâce à des modèles de souris mutées pour des composants du complexe PAS. Un knock-out total de PIKFyve mène à une mort embryonnaire à un stade précoce (E3,5)

(Ikonov et al., 2011). Les souris invalidées pour Vac14 meurent quelques jours après la naissance et montrent des défauts majeurs au niveau du système nerveux, avec la présence anormale de vacuoles endolysosomales dans les neurones (Y. Zhang et al., 2007). D'autres types cellulaires sont aussi touchés par la perte des acteurs moléculaires du PAS. Notamment, la délétion conditionnelle de PIKFyve dans les cellules de l'intestin de souris (PIPKIII-Deficient IEC (*intestinal Epithelium cells*)) induit comme dans les neurones une augmentation anormale de vacuoles endolysosomales accompagnée d'une inflammation et d'une fibrose intestinale (Takasuga et al., 2013). L'inhibition de PIKFyve dans les plaquettes suite à un traitement de la souris par la drogue l'apilimod (STA-5326) provoque une thrombose artérielle et une réponse inflammatoire inappropriée (Min et al., 2014). Une délétion de PIKFyve spécifique dans le muscle squelettique n'est pas délétère pour la souris et induit des signes pathologiques modérés qui se traduisent par une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline et une hyperinsulénémie (Ikonov et al., 2013). PIKFyve et le PI(3,5)P₂ semblent donc jouer un rôle important dans la physiologie de plusieurs tissus.

Rôles du PI(3,5)P₂ dans la régulation des fonctions lysosomales

La dynamique lysosomale

Des événements de fusion membranaire permettent la distribution des cargos dans les lysosomes ainsi que pour échanger une partie de leurs cargos entre eux. Cette fusion met en jeu de nombreuses protéines et implique particulièrement les complexes trans-SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment membrane*) (Luzio et al., 2007). Cependant, certains processus de fusion semblent faire intervenir des protéines assez spécifiques. Hasegawa et ses collaborateurs montrent en 2016 que la fusion entre le lysosome et l'autophagosome fait intervenir INPP5E (*Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase E*), une PI-5-phosphatase minoritaire qui transforme le PI(3,5)P₂ en PI3P. En effet, une mutation de cette protéine semble empêcher la fusion entre ces deux vésicules (Hasegawa et al., 2016). Il a été proposé que PI(3,5)P₂ lie directement la cortactine et INPP5E permet ainsi de libérer la cortactine pour qu'elle puisse lier des fibres d'actine à proximité du lysosome. Ce processus va permettre la stabilisation de ce "cytosquelette lysosomal" et ainsi la fusion entre l'autophagosome et le lysosome (**Figure 12**). Lors de l'inhibition de PIKFyve et l'absence de synthèse de PI(3,5)P₂ ce phénomène est abrégé et mène au blocage des étapes tardives de l'autophagie (Hasegawa et al., 2016).

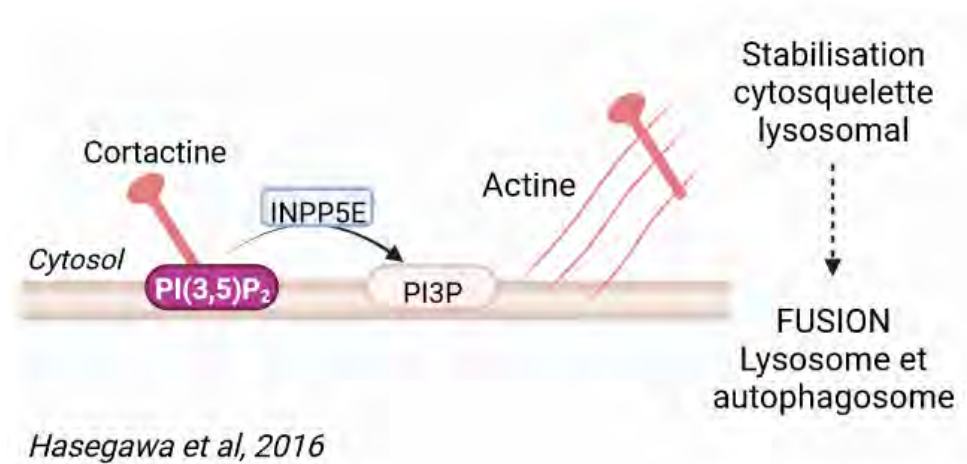


Figure 12 : Rôle du PI(3,5)P₂ dans la fusion du lysosome via le recrutement de la cortactine.

D'autre part le lysosome peut aussi fissionner afin de maintenir un nombre, une taille et des fonctions optimales. Ces deux phénomènes peuvent se produire par des événements de vésiculation ou tubulation, par scission et aussi via des cycles de "kiss-and-run" permettant la création de pore temporaire entre deux lysosomes (**Figure 13**). Cependant, la fission des lysosomes est bien moins étudiée, elle semble dépendre d'une machinerie protéique assez variée et spécifique à chaque événement. La vésiculation dépendrait de protéines assez connues pour cette fonction comme la clathrine, la dynamine et les protéines adaptatrices. Pour les autres acteurs de la fission, des protéines ont été identifiées grâce à des mutations menant à des dysfonctions de la fission lysosomale. Par exemple des mutations dans les gènes codant la spatascine ou la spastizine empêchent la reformation de nouveaux lysosomes par fission d'un autophagolysosome (Saffi & Botelho, 2019).

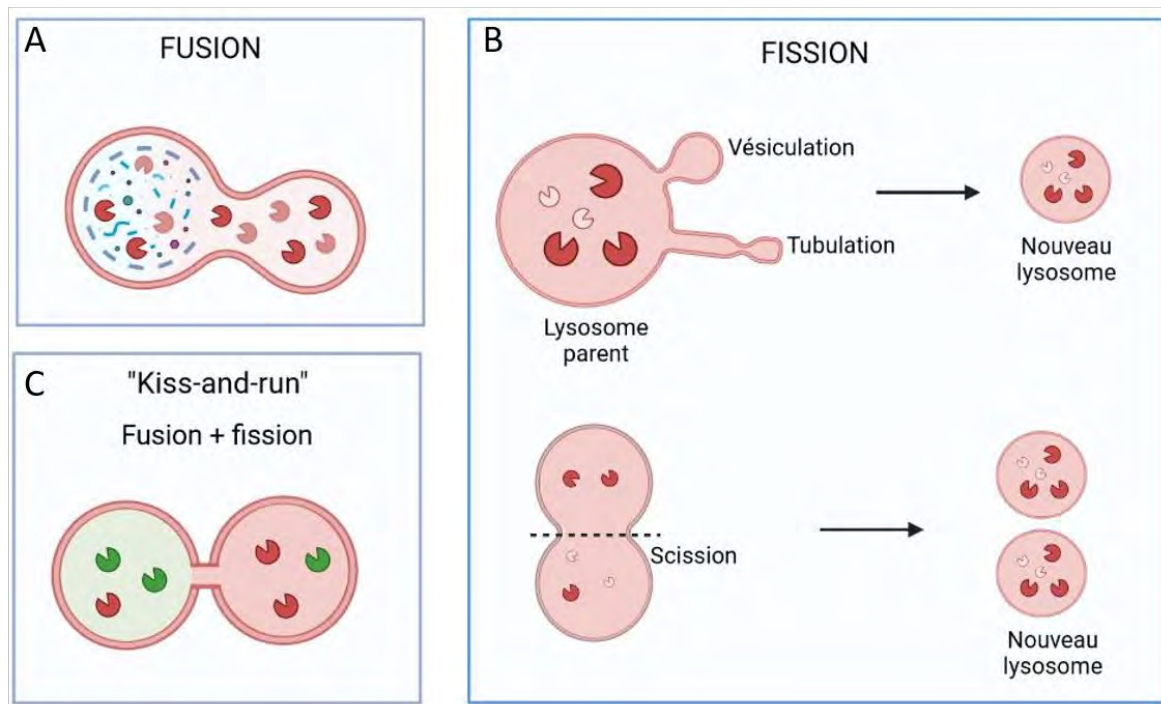


Figure 13 : Stratégie de fusion et de fission du lysosome. **(A)** Le lysosome peut fusionner avec différentes organelles telles que des autophagosomes ou des endosomes tardifs. Le cargo présent dans son cytoplasme sera alors dégradé. **(B)** Le lysosome peut déformer sa membrane via des protéines “manteau” (comme la clathrine) et former de nouvelles vésicules libérées par scission qui deviendront de nouveaux lysosomes. Ces vésicules peuvent aussi s’étendre avant leur scission devenant des tubules. Ils peuvent aussi subir une scission dans leur région médiane via des complexes moteur du cytosquelette, se séparant ainsi en deux nouvelles organelles. **(C)** Les lysosomes peuvent faire une fission partielle formant un pore (kiss) suivi par une scission (run) afin de prévenir une coalescence des deux lysosomes en un seul compartiment.

La signalisation calcique du lysosome

L’utilisation de stratégie de knockdown dans plusieurs types cellulaires appuyée par des inhibiteurs pharmacologiques tels que l’apilimod (STA-5326) a permis de montrer des défauts communs du trafic endolysosomal (vacuolisation) mais aussi un blocage de l’autophagie (accumulation du marqueur LC3-II et p62) (de Lartigue et al., 2009; Ferguson et al., 2009; Martin et al., 2013). Ce phénotype de vacuolisation assez spectaculaire a suscité la curiosité. Ainsi plusieurs travaux ont essayé de le connecter directement au PI(3,5)P₂. Par exemple, la surexpression de TRPML1, un canal calcique à la membrane des endosomes et des lysosomes, restaure ce phénotype dans des cellules déplétées de la fonction de PikFyve ou de Fig4 (Q. Cao et al., 2015; X.-P. Dong et al., 2010). Ces résultats suggèrent que ce phénotype est en partie dû à des défauts d’homéostasie ionique. Suivant la même logique il a été montré que le PI(3,5)P₂ active d’autres canaux ioniques comme TPC1 et 2 (*two-pore channel 1 et 2*), qui

permettent le relargage du calcium des endo/lysosomes vers le cytosol (X. Wang et al., 2012). Ce flux calcique va induire des signaux cellulaires multiples y compris une augmentation de la fusion des lysosomes. Ainsi ces travaux suggèrent l'idée qu'à travers son action sur les canaux calciques, le PI(3,5)P₂ contrôlerait la fusion et la fission lysosomale. Cependant, la démonstration moléculaire de l'implication de ces canaux sur la fusion ou la fission des lysosomes n'est pas encore établie (**Figure 14 A et B**).

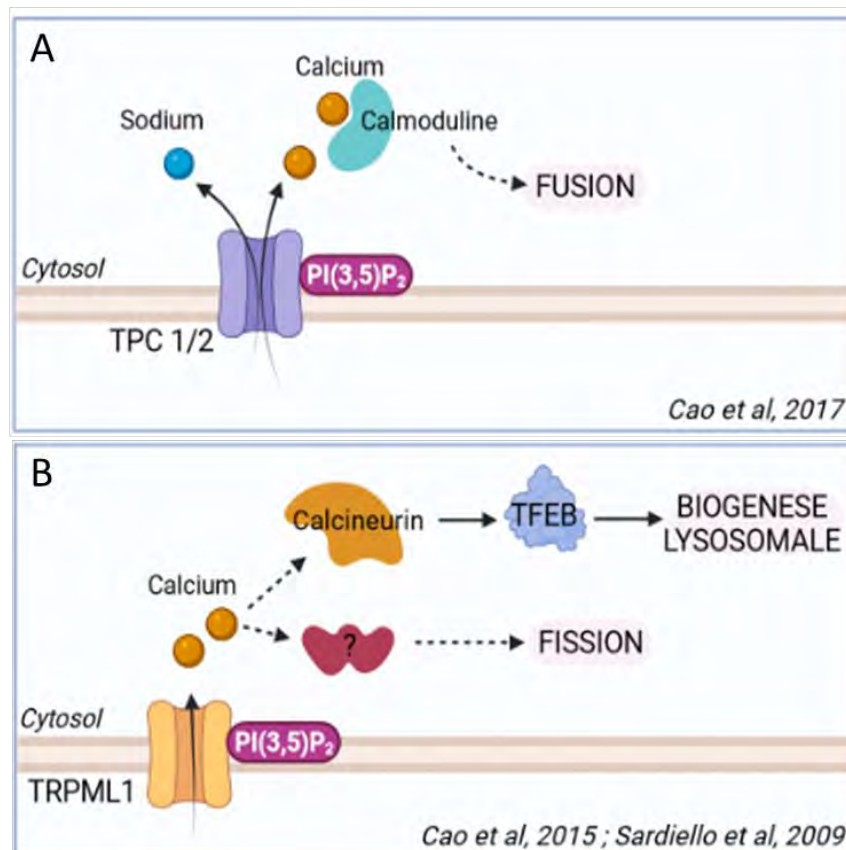


Figure 14 : Rôles du PI(3,5)P₂ sur les canaux calcique lysosomal TCP1/2 et TRPML1 entrainant des défauts de la fusion lysosome-autophagosomes ainsi que de la fission lysosomale.

Il est aussi important de signaler que le calcium est aussi un élément essentiel pour la biogenèse lysosomal via le senseur au calcium la Calcineurine. En effet, le lysosome est aussi capable de gérer sa propre biogenèse grâce au facteur de transcription TFEB (*Transcription factor EB*) (Napolitano & Ballabio, 2016). Lors d'une privation en nutriment TFEB est déphosphorylé par la calcineurine, une phosphatase activée localement grâce au relargage de calcium par le lysosome. Activé, TFEB transloque dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles impliqués dans la biogenèse des lysosomes. Biologiquement cela va servir à augmenter la dégradation des protéines et autres macromolécules afin de réapprovisionner la cellule en nutriment. Au contraire lors de la présence de nutriments, le complexe mTORC1 est

recruté au lysosome et va phosphoryler TFEB afin de le séquestrer dans le cytosol (Medina et al., 2015), et ainsi inhiber la biogenèse de nouveaux lysosomes (Figure 15).

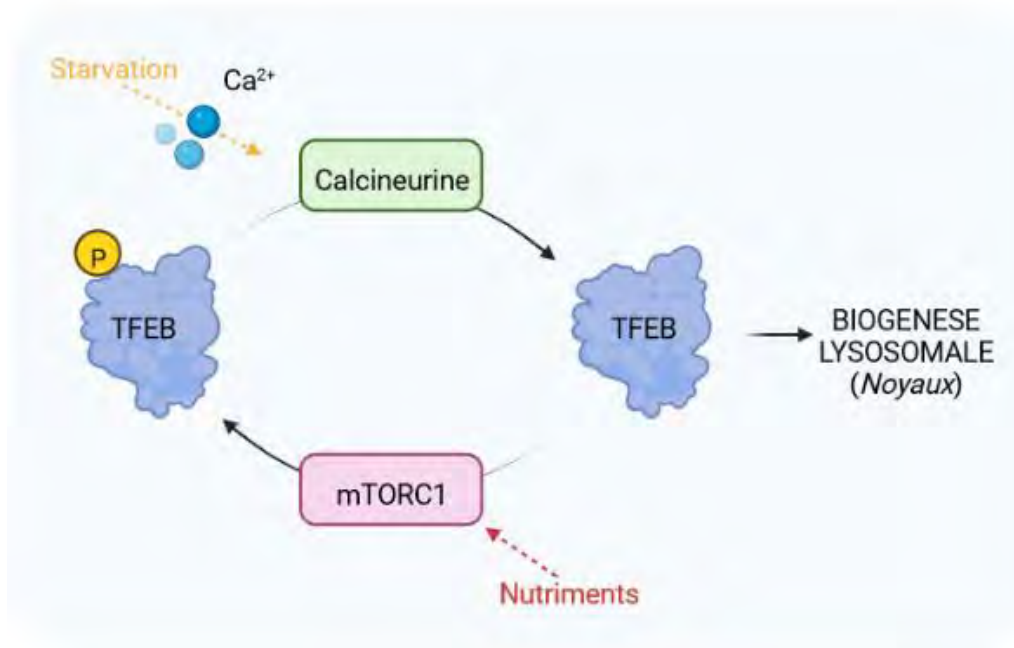


Figure 15 : Biogenèse lysosomale via TFEB et le calcium.

Un autre exemple du lien potentiel entre le $PI(3,5)P_2$ et les canaux calciques a été suggéré dans une étude en 2009. Dans la souris *Jumpy/MTMR14-KO*, une PI3-phosphatase faisant partie de la famille des Myotubularines, les auteurs ont montré que le $PI(3,5)P_2$ se lie au récepteur de la Ryanodine RyR1. L'accumulation du $PI(3,5)P_2$ enclenche une stimulation permanente de RyR1 menant à une fuite du calcium du réticulum sarcoplasmique et un défaut des cycles excitation-contraction du muscle squelettique (J. Shen et al., 2009) (Figure 16A).

A noter qu'en plus des canaux calciques, le $PI(3,5)P_2$ peut aussi avoir un rôle dans le contrôle d'autres types de « récepteurs » à la membrane du lysosome. Il a été mis en cause dans le relargage des protons via la pompe v-ATPase qui contrôle l'acidification des lysosomes. L'étude de Li et coll. montre que le $PI(3,5)P_2$ se lie avec la sous-unité membranaire V0 du complexe ce qui permet de le stabiliser et au final d'augmenter son activité (S. C. Li et al., 2014) (Figure 16B), il aurait ainsi un rôle dans la fonction dégradative du lysosome.

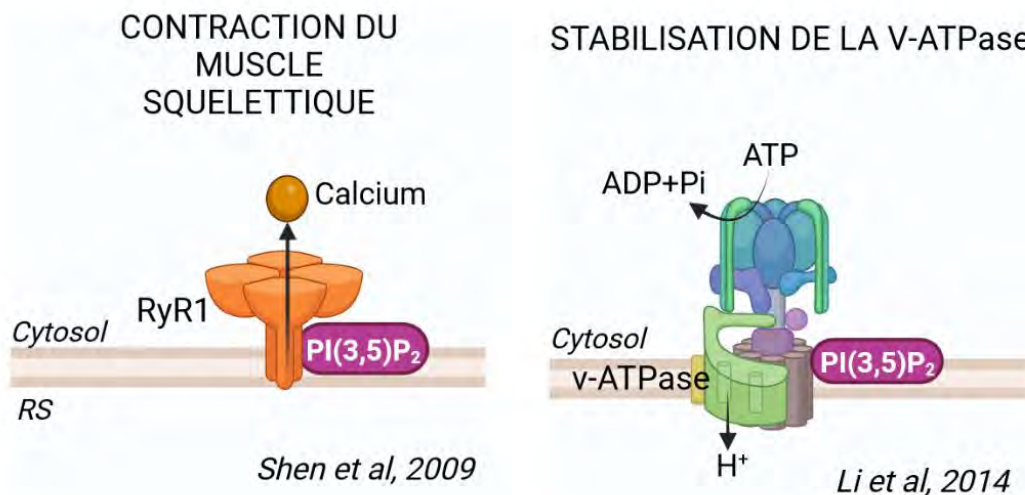


Figure 16 : Rôles du PI(3,5)P₂ sur les canaux et pompe lysosomal. (A) dans la fonction musculaire via l'homéostasie du calcium. (B) dans la fonction de dégradation lysosomal via la stabilisation de la v-ATPase responsable de l'acidification du lysosome.

Les contacts entre structure

Le lysosome est capable d'interagir physiquement avec d'autres structures tels que le réticulum endoplasmique, le Golgi ou encore les mitochondries.

Les contacts avec le RE promeuvent différentes actions du lysosome, notamment le transport et la mobilité du lysosome. Le lysosome se déplace entre la périphérie de la cellule et son centre en fonction notamment des apports nutritionnels de la cellule, permettant d'activer mTORC1 (anabolisme) ou au contraire d'être disponible à la dégradation par autophagie (catabolisme). Ces contacts sont assurés par des liaisons protéine-protéine (RE : VAP-A, VAP-B (*VAMP-associated protein*) et MOSPD2 (*motile sperm protein domain-containing 2*) liant des motifs FFAT de protéines endosomales) mais peuvent aussi être formés par des interactions entre lipides membranaires et protéines. C'est le cas de la protéine du RE, la Protrudine, qui peut se lier au PI3P et à Rab7 sur les endosomes tardifs/lys et permet la liaison à des protéines motrice telles que la kynesine ou la dyneine (Di Mattia et al., 2020).

Ces contacts sont aussi nécessaires pour l'échange de lipides tel que le cholestérol. En effet, ce lipide peut être échangé et transporté dans la cellule grâce au système endosomal. Les endosomes utilisent pour cela la protéine STARD3, un transporteur de cholestérol appartenant à la famille des START (*steroidogenic acute regulatory protein related lipid transfert*) contenant un domaine FFAT. L'ultrastructure montre que les lysosomes positifs pour STARD3 peuvent être enveloppés par la membrane du RE. Des sondes fluorescentes montrent le transfert de cholestérol entre ces deux organelles du RE, lieu de synthèse du lipide vers les endosomes

(Alpy et al., 2001, 2013; Wilhelm et al., 2017). Dans ces transports de cholestérol des PIs ont récemment montré être plus ou moins impliqués. Par exemple, le PI(4,5)P₂ et le PI(3,4)P₂ facilitent le recrutement de ORP1 (*oxyterol-binding protein homologue 1*), une autre protéine de transport du cholestérol, à la membrane et aide ainsi le transport et l'extraction du cholestérol (J. Dong et al., 2019).

Il est important de noter que le signal calcique entre le lysosome et le RE semble important pour former ces contacts. En effet TCP1 (un des canaux calciques du lysosome) se retrouve au niveau de ces zones de contact et sa déplétion entraîne la diminution des contacts (Kilpatrick et al., 2017).

Plateforme signalétique

Enfin un point très important est le rôle du lysosome comme plateforme signalétique. La surface du lysosome sert de recrutement de complexe protéique majeur comme mTORC1, AMPK et GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) et même à l'inflammasome. L'hypothèse est que le lysosome est une structure dynamique qui peut être le reflet de l'état de la cellule à un moment précis. De nombreux signaux arrivent aux lysosomes : la disponibilité en acide aminés contenu à l'intérieur de lui-même mais aussi dans le cytoplasme grâce aux transporteurs et senseurs qu'il possède (**Figure 10**). Mais aussi les contacts avec d'autres organelles et la présence de cholestérol, la présence en facteurs de croissance, ...

Les complexes protéiques présents à sa surface lui permettent d'intégrer ces signaux multiples et d'avoir un rôle très important dans les signaux anaboliques telles que la synthèse protéique et lipidique, via le complexe mTORC1 actif, ou dans le catabolisme, via AMPK et mTORC1.

Ce qui m'intéresse dans mon projet est le recrutement de mTORC1 sur le lysosome. En effet, aujourd'hui plusieurs pistes montrent que ce complexe mTORC1 pourrait être régulé par le PI3P, le PI(3,5)P₂ ou encore le PI(3,4)P₂. Je détaillerai les travaux menés à ce sujet après avoir introduit au mieux mTORC1 et le contexte cellulaire et pathologique dans lequel je me place.

Chapitre 2. Les myotubularines et la myopathie centronucléaire lié à l'X

2.1. Famille et structure des myotubularines.

2.1.1 Biochimie et enzymologie des MTMs

Les myotubularines (MTMs) sont une famille de protéines composées de 14 membres (MTM1 ; MTMR1-MTMR13). MTMR14/Jumpy a été incluse dans cette famille en vue de la conservation de son domaine phosphatase avec les MTMs actives. En effets les MTMs sont subdivisées en 2 groupes (**Figure 18**) :

- 1) Les MTMs actives (MTM1, MTMR 1-4, 6-8 et 14) qui contiennent un site catalytique conservé capable d'hydrolyser le PtdIns(3,5)P₂ en PtdIns(3)P et le PtdIns(3,5)P₂ en PtdIns (Blondeau et al., 2000; Wishart & Dixon, 2002).
- 2) Les MTMs inactives (MTMR 5 et 9-13) qui ont perdu cette fonction enzymatique mais qui jouent un rôle de soutien aux MTMs actives en s'associant avec celles-ci (formation d'hétérodimères MTMs actives-MTMs inactives).

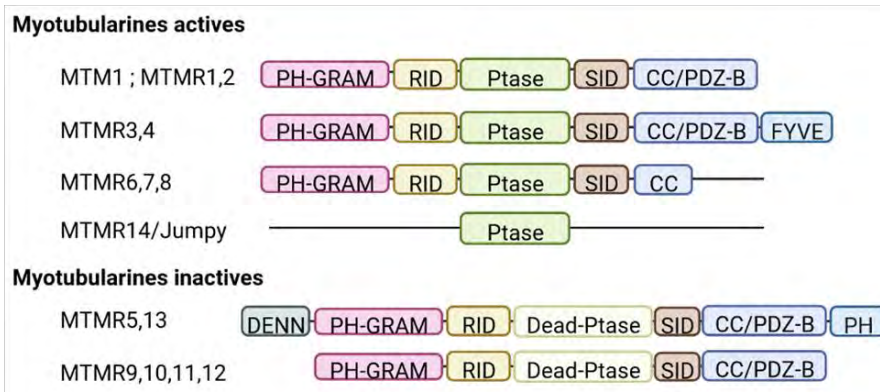
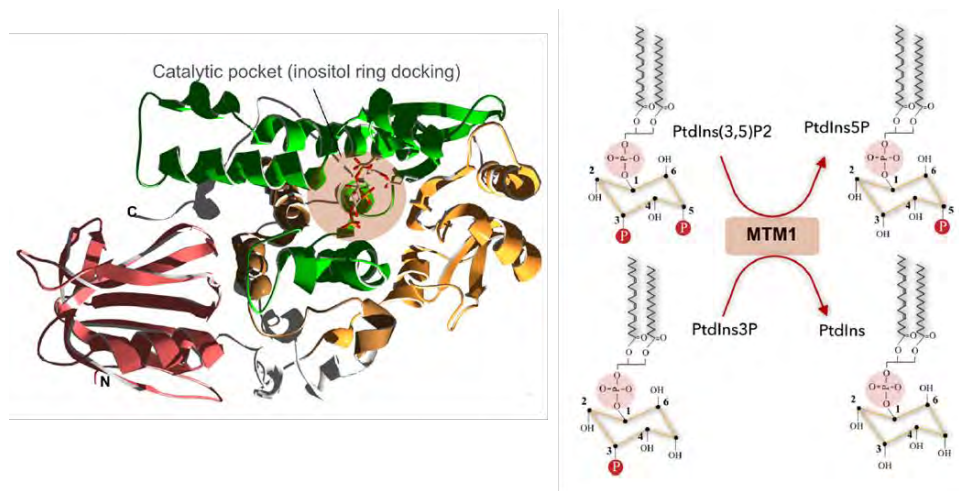


Figure 17 : Cartographie de MTM1 : la protéine et les mutations associées. Le modèle cristallographique (structure élaboré à partir de celle de MTMR2). Le code couleur désigne les structure (Rouge : PH-GRAM ; Jaune : RID ; Vert : Ptase (*phosphatase*) ; Marron : SID). Le cœur du site catalytique est signalée par un cercle rouge. Sous un autre plan on peut constater que ce site est exceptionnellement profond comparé à d'autre phosphatase (PTP/DSP), permettant ainsi de laisser passer que le noyau inositol et difficilement une séquence peptidique d'où la spécificité de MTM1 vis-à-vis de ces lipides, particulièrement le PI3P et le PI(3,5)P₂. En bas de la figure les domaines des myotubularines actives et inactives.

Les premières études sur le domaine **PH-GRAM** (*pleckstrin homology-glucosyltransferases Rab-like*) (Doerks et al., 2000) ont montré qu'il permet de lier les phosphoinositides et de relocaliser des MTMs aux membranes (Tsujita et al., 2004). Cependant, ce rôle de liaison aux PIs est très discuté puisque l'affinité du domaine PH-GRAM aux PIs serait trop faible pour être biologiquement pertinente (Begley et al., 2003). Il a été proposé que certaines MTMs possèdent une affinité vis-à-vis des membranes indépendamment de la reconnaissance des substrats par le domaine PH-GRAM. C'est le cas de MTMR2 qui est électrostatiquement polarisée et présente des charges positives à l'interface des sites de contacts avec les membranes, favorisant ainsi le rapprochement avec ses substrats (Begley et al., 2006). L'autre possibilité est que les MTM inactives seraient les recruteuses des MTMs actives à proximité de leurs substrats (Lorenzo et al., 2006). Appuyant cela, la perte de certaines MTMs inactives s'accompagne par une délocalisation de leurs partenaires actifs et une baisse significative de leurs activités phosphatases (S.-A. Kim et al., 2003; Mochizuki & Majerus, 2003). Mise à part le PH-GRAM, il a été proposé que les MTMs possèdent un domaine **RID** (*rac-induced recruitment*) capable de favoriser le recrutement des MTMs à des compartiments membranaires spécialisés. Nous pouvons citer celui de MTM1 qui permettrait à la protéine de se localiser au niveau des domaines membranaires « lipid raft » riches en Rac1 (Laporte et al., 2002).

Le domaine **PTP/DSP** (*protein tyrosin phosphatase/dual specificity phosphatase*) est le domaine catalytique caractéristique des protéines tyrosines phosphatases. Il a été identifié grâce à la présence du motif: C(X)₅R. Il possède une affinité particulière pour les phosphoinositides et non pas pour les peptides (poches catalytiques profondes et de faibles diamètres ne pouvant accueillir que le noyau inositol). Ce motif est impliqué dans les différentes étapes de réaction enzymatique. Les premières étapes servent à enlever le groupement phosphate sur le noyau inositol grâce aux résidus cystéines (C) et arginines (R) puis un groupement hydroxyl non-chargé est recréé grâce à un acide aspartique conservé d'une région structurellement proche (Fauman & Saper, 1996). Ainsi, une de la cystéine (C) du site

catalytique en sérine (S) (Mtm1^{C375S}) abolit totalement l'activité enzymatique de MTM1 (Blondeau et al., 2000), cette mutation est utilisée afin de déterminer la part des phénotypes de la pathologie associée à l'activité phosphatase (Amoasii et al., 2012).

Enfin le domaine **SID** (*set-interacting*) et le domaine **CC/PDZB** (*coiled-coil/PDZ-binding*) permettent des interactions avec d'autres protéines. Le domaine **CC** a un rôle dans la dimérisation des myotubularines. Par exemple, MTM1 est capable de former un hétérodimère avec MTMR10 ou MTMR12, MTMR2 avec MTMR5 ou MTMR13 et MTM7 avec MTMR9. Ces complexes permettent ainsi de réguler la localisation cellulaire, l'activité mais aussi la stabilité des MTMs actives (A. Gupta et al., 2013; S.-A. Kim et al., 2003; Mochizuki & Majerus, 2003).

2.1.2 Localisation des MTMs

D'après les bases de données, l'expression des MTMs est ubiquitaire dans les tissus et les cellules en culture. Cependant il existe quelques exceptions. Pour exemple, MTMR7 est exprimée seulement dans le cerveau alors que MTM1 possède une expression importante dans les ovaires et dans les poumons (base de données GTEx). Il est à noter que d'après ces bases de données, MTM1 a une expression assez faible dans le muscle squelettique malgré son implication directe dans une pathologie musculaire.

L'étude de la localisation intracellulaire de MTM1 reste complexe du fait de l'absence d'anticorps suffisamment spécifiques dans les modèles cellulaires. Dans un premier temps, dans des cellules COS7, MTM1 a été décrite comme localisé à la membrane plasmique en réponse à l'induction des « ruffles » membranaires suite à l'activation de Rac1 (via son domaine RID) (Laporte et al., 2002). Dans des cellules en culture, C2C12, la surexpression de la protéine MTM1 a montré la présence de la protéine dans le cytoplasme (Blondeau et al., 2000; Nandurkar et al., 2003). Elle est plus largement supposée au niveau des endosomes (C. Cao et al., 2007; Ketel et al., 2016) et endosomes tardifs (Tsuji et al., 2004). En 2010 Velichkova et ses collaborateurs montrent qu'une fraction du marquage de mtm (homologue MTM dans les drosophiles) est détectée pas uniquement dans les endosomes et les lysosomes mais aussi à l'intérieur de certaines vésicules rappelant un marquage de l'autophago-lysosome (Velichkova et al., 2010).

Cependant, dans le muscle squelettique, certaines études sur des coupes de muscle montrent que MTM1 serait localisée au niveau du réticulum sarcoplasmique (RS) et enrichie dans les triades (association de deux saccules du RS avec les T-tubules) et à proximité des stries Z (Amoasii et al., 2012; Buj-Bello et al., 2008; Hnia et al., 2011).

2.1.3 Myotubularines et pathologies

De nombreuses MTMs sont impliquées dans des pathologies monogéniques et chroniques. Des mutations dans le gène *MTM1* est responsable d'une myopathie congénitale néonatale sévère liée au chromosome X appelée la myopathie myotubulaire ou la myopathie centronucléaire (XLCNM ; *X-linked centronuclear myopathy*, OMIM 310400). De même, des mutations dans *MTMR2* et *MTMR13* sont responsables de la maladie de Charcot-Marie-Tooth 4B1 et 4B2 respectivement, une maladie neurologique héréditaire touchant les nerfs périphériques et entraînant une paralysie progressive des jambes et des mains. *MTMR3* est associée avec le risque accru de cancer gastrique, du colon ou encore du poumon. *MTMR9* avec l'obésité et le syndrome métabolique, enfin *MTMR7* et *MTMR9* avec des formes d'épilepsie.

2.2. La myopathie centronucléaire lié à l'X.

2.2.1 Les mutations

Le gène *MTM1* a été séquencé en 1996 suite à plusieurs études d'association qui ont identifié la région chromosomique (Xq28) qui ségrége dans plusieurs familles avec des individus atteints de XLCNM. Ce gène comporte 15 exons et est précédé par une région génomique de deux kilobases (kb) contenant le promoteur théorique (Laporte et al., 1996). Actuellement le site « The human gene mutation database » recense plus de 300 mutations dans le gène *MTM1*, qui sont dispersées de façon aléatoire tout le long du gène. La majorité (69,8%) des mutations entraîne une substitution avec comme conséquence un faux-sens ou un codon stop précoce, s'en suit les délétions (18,2%), les duplications (6,5%) puis les insertions et les indels dans les exons du gène. Le plus souvent, les mutations reportées induisent une perte de fonction ou tout simplement l'absence de la protéine (**Figure 18**).

Il n'y a pas de lien établi entre le génotype et le phénotype. En effet, une même mutation peut induire des phénotypes musculaires plus ou moins graves (McEntagart et al., 2002). Cependant la présence de mutations conduisant à une absence de protéine, ou à une protéine tronquée, est presque toujours associée à une taille de myofibres réduite et une durée de vie courte chez les patients. Alors que les mutations faux-sens sont associées à une atteinte moins sévère de la taille des myofibres et une durée de vie plus importante (Beggs et al., 2018; McEntagart et al., 2002; Pierson et al., 2007). Néanmoins cette myopathie reste parmi les plus sévères et l'espérance de vie dans les cas les plus modérés ne dépasse pas l'adolescence.

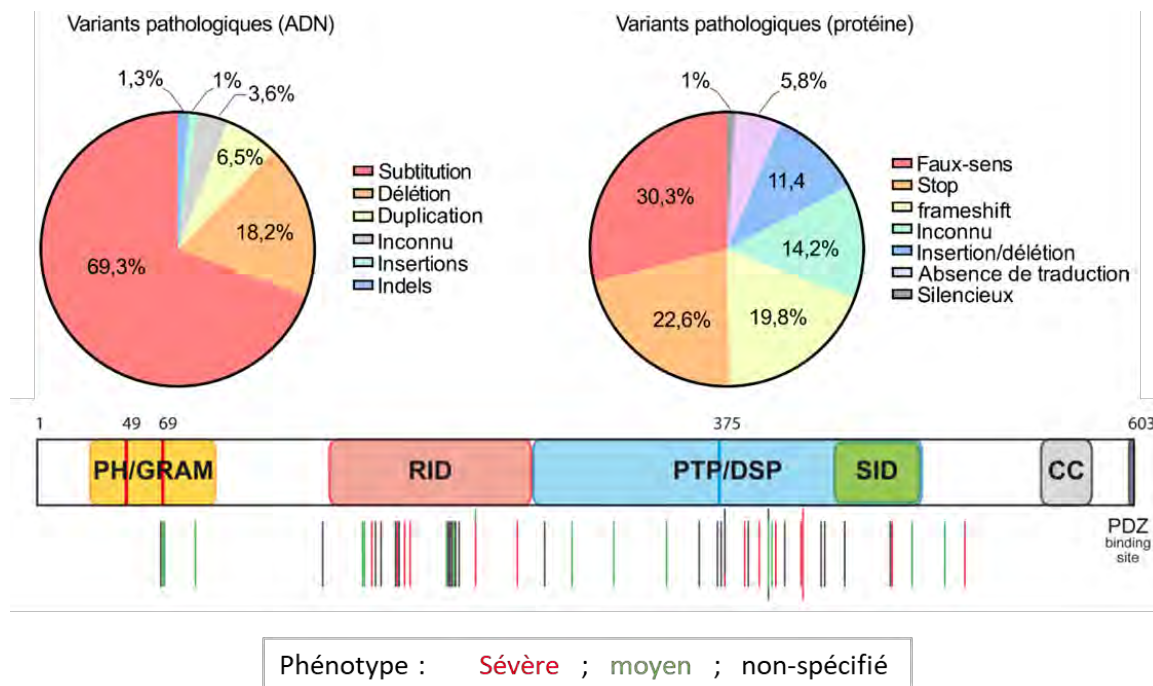


Figure 18 : Mutations et organisation du gène Mtm1. (A) Répartition des conséquences des variants pathologiques sur l'ADN (camembert gauche) ou sur la protéine (camembert droit) (*d'après LOVD*). (B) Le gène de MTM1 est représenté de manière schématique avec ses différents domaines. Chaque trait représente une mutation décrite et la couleur associée correspond au degré de sévérité du phénotype XLMTM décrit (*Extrait de Bertazzi et al. 2015*).

2.2.2 La myopathie centronucléaire lié à l'X : Description clinique, diagnostic et étiologie.

L'incidence des myopathies centronucléaires (CNM) est de 1-2 cas /100.000 naissances et environ 50% des cas sont des XLCNM. D'autres formes de CNMs existent. Les deux majoritaires après XLCNM sont : une forme de CNM à transmission autosomique dominante (*ADCNM*) avec des mutations dans le gène *DNM2* codant la GTPase Dynamine 2 (15% des CNM) et la forme autosomique récessive (*ARCNM*) avec des mutations dans le gène

AMPH2/BIN1 codant la protéine à BAR domaine Amphiphysin 2/BIN1 (3% des cas des CNMs environ). D'autres gènes comme le gène *RYR1*, *TTN* (codant la Titin) ou encore plus récemment *SPEG* causent 12% des CNM ou « CNM-like ». Enfin, 20% des cas diagnostiqués avec un phénotype CNM ou CNM-like ne sont pas encore liés à un gène connu.

L'atteinte des patients ADCNM et ARCNM est généralement moins importante comparée aux patients XLCNM qui ont besoin d'assistance respiratoire très tôt (Jungbluth et al., 2008; Romero, 2010). Ces patients manifestent pendant la vie fœtale des symptômes comme la polyhydramnios (excès de liquide amniotique pendant la grossesse) ou encore des mouvements fœtaux réduits. Dès la naissance, les patients montrent une hypotonie des muscles squelettiques, une ophtalmoplégie externe progressive (hypotonie des muscles de la face) et une défaillance respiratoire (Jungbluth et al., 2008). Outre ces symptômes musculaires typiques, ces patients peuvent développer d'autres complications comme des anomalies de la cage thoracique (Smets, 2008) ou encore des dysfonctionnements du foie (Jungbluth et al., 2008). Les causes de ces complications ne sont pas encore très bien comprises.

2.3. Le muscle squelettique sain vs l'XLCNM.

La prédominance de l'atteinte musculaire chez les patients a focalisé les recherches concernant la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la perte de MTM1 dans le muscle squelettique. Avant de détailler le phénotype musculaire des XLCNM, j'énoncerai quelques notions importantes sur la biologie et la physiologie du muscle squelettique en général. C'est un organe qui remplit deux fonctions physiologiques essentielles :

1) La contractilité et l'élasticité qui permettent tous les mouvements volontaires et assure le maintien de la posture.

2) La régulation du métabolisme en général et du métabolisme glucidique : absorption du glucose circulant et conversion en pyruvate générant ainsi de l'ATP (Glycolyse, conversion anaérobie). Le pyruvate est pris en charge par la mitochondrie (cycle de Krebs) ce qui génère un deuxième pool d'ATP par aérobie. L'ATP est une source d'énergie pour la contraction musculaire (entre autres, le couplage de l'actine et de la myosine sarcomérique). Le muscle squelettique absorbe aussi d'autres métabolites tels que les acides gras et les acides aminés. Il est aussi un organe paracrine à travers la sécrétion de cytokines et de médiateurs appelés les myokines.

2.3.1 Le muscle sain : développement et organisation.

Le développement du muscle squelettique : la myogenèse.

La myogenèse est la formation du tissu musculaire qui a d'abord lieu lors du développement de l'embryon, puis lors de la régénération musculaire.

Au cours du développement, les progéniteurs myogéniques migrent vers les futurs emplacements des muscles squelettiques où ils donnent naissance aux cellules satellites responsables de la réparation et de la régénération post-natale de muscles squelettiques. Ces cellules satellites (marquées par une forte expression du facteur de transcription Pax7) prolifèrent puis se déterminent en myoblaste sous l'influence de facteurs de transcription myogénique (*MRF*) : MyoD et Myf5. Les myoblastes subissent alors une dernière phase de prolifération dans le but d'engendrer un nombre suffisant de cellules pour la formation de la future cellule polynucléée (Myotubes), précurseurs de la fibre musculaire. A la sortie du cycle cellulaire les myoblastes commencent leur différenciation. A la fin de cette étape de différenciation les cellules seront appelées des myocytes, ce sont toujours des cellules mononucléées mais qui expriment la myogénine (*MyoG*) un autre MRF qui active la transcription de gènes impliqués dans la différenciation musculaire. Les myocytes vont ensuite adhérer avec le myocyte voisin et fusionner entre eux formant ainsi des myotubes primaires. Les étapes successives de fusion mèneront à la formation de myotubes plus matures. Enfin, la dernière phase de maturation arrive sous le contrôle de l'innervation pour former des myofibres ou fibres musculaires (**Figure 19**).

Ex-vivo ce phénomène de maturation peut être reproduit notamment avec les cellules en culture C2C12 qui est une lignée immortalisée de myoblastes de souris, qui après une phase de prolifération se différencie en condition de faible disponibilité en sérum jusqu'à obtenir des myotubes.

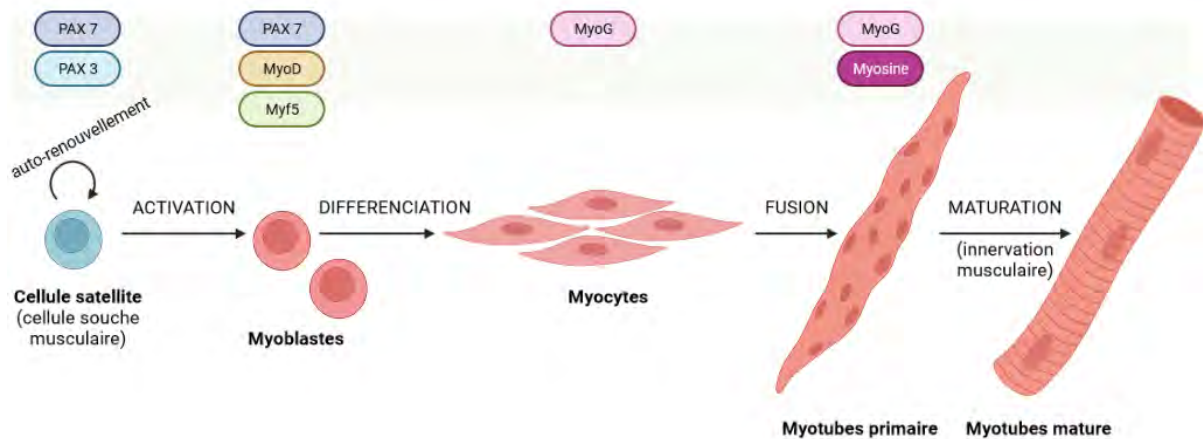


Figure 19 : Développement du muscle squelettique : La myogenèse.

L'organisation du muscle mature.

Le muscle est composé de groupes de fibres musculaires (appelé aussi myofibrilles), organisés en faisceau. Chaque faisceau qui compose le muscle est délimité par une couche de tissu conjonctif appelé le périmysium. Dans un faisceau il y a de nombreuses fibres qui sont séparées entre elles grâce à une dernière couche de tissu conjonctif appelé l'endomysium et par une membrane cellulaire appelée sarcolemme (**Figure 20 A**).

Après sa formation lors du développement embryonnaire, la croissance du muscle s'opère selon deux modes qui se chevauchent parfois : l'augmentation du nombre des fibres et l'augmentation de la taille des fibres. Du stade fœtal jusqu'à la naissance, les progéniteurs (myoblastes) se divisent, se différencient en myocytes, pour enfin fusionner entre eux et assurer la formation d'un syncytium plurinucléé (myotube) qui maturera en fibre musculaire.

Chez l'homme, une fibre musculaire mesure une centaine de micromètres de diamètre et peut atteindre plusieurs centimètres de longueur. Le cytoplasme de la fibre musculaire est nommé sarcoplasme et est principalement composé de myofibrilles mais aussi d'organites cellulaires tels que l'appareil de Golgi, les mitochondries ou le réticulum sarcoplasmique et des noyaux situés en périphérie des fibres dans le muscle normal. Les myofibrilles sont des structures organisées composées de filaments d'actine (filaments fins) et de myosine (filaments épais) principalement. L'enchevêtrement des différents filaments est organisé en sarcomère, l'unité contractile du muscle. Le sarcomère est délimité par deux stries Z/disque Z, région dans laquelle les filaments d'actine se réunissent. Il est constitué de deux bandes I contenant des filaments fins qui entourent la bande A dans laquelle les filaments fins et épais se chevauchent. Au centre de la bande A, la ligne M est le point de liaison des filaments épais. La desmine, une protéine caractéristique des tissus musculaires, forme un troisième réseau de filaments

(filaments intermédiaires) et est localisée au niveau du disque Z. Les filaments d'actine sont parcourus par des complexes de troponine et de tropomyosine qui régulent l'interaction entre filaments fins et épais (**Figure 20B et 20C**).

Les deux principaux types de fibres musculaires sont distingués en fonction des chaînes de myosine qui composent les sarcomères. Les fibres de type I sont caractérisées par la présence de formes lentes de myosine (type I), elles sont les premières formées au cours du développement, et utilisent le métabolisme oxydatif pour réaliser des contractions lentes. Les fibres de type II ont une prépondérance de myosines rapides (type II) et un métabolisme oxydatif (type IIa) ou glycolytique (type IIb) à contraction rapide.

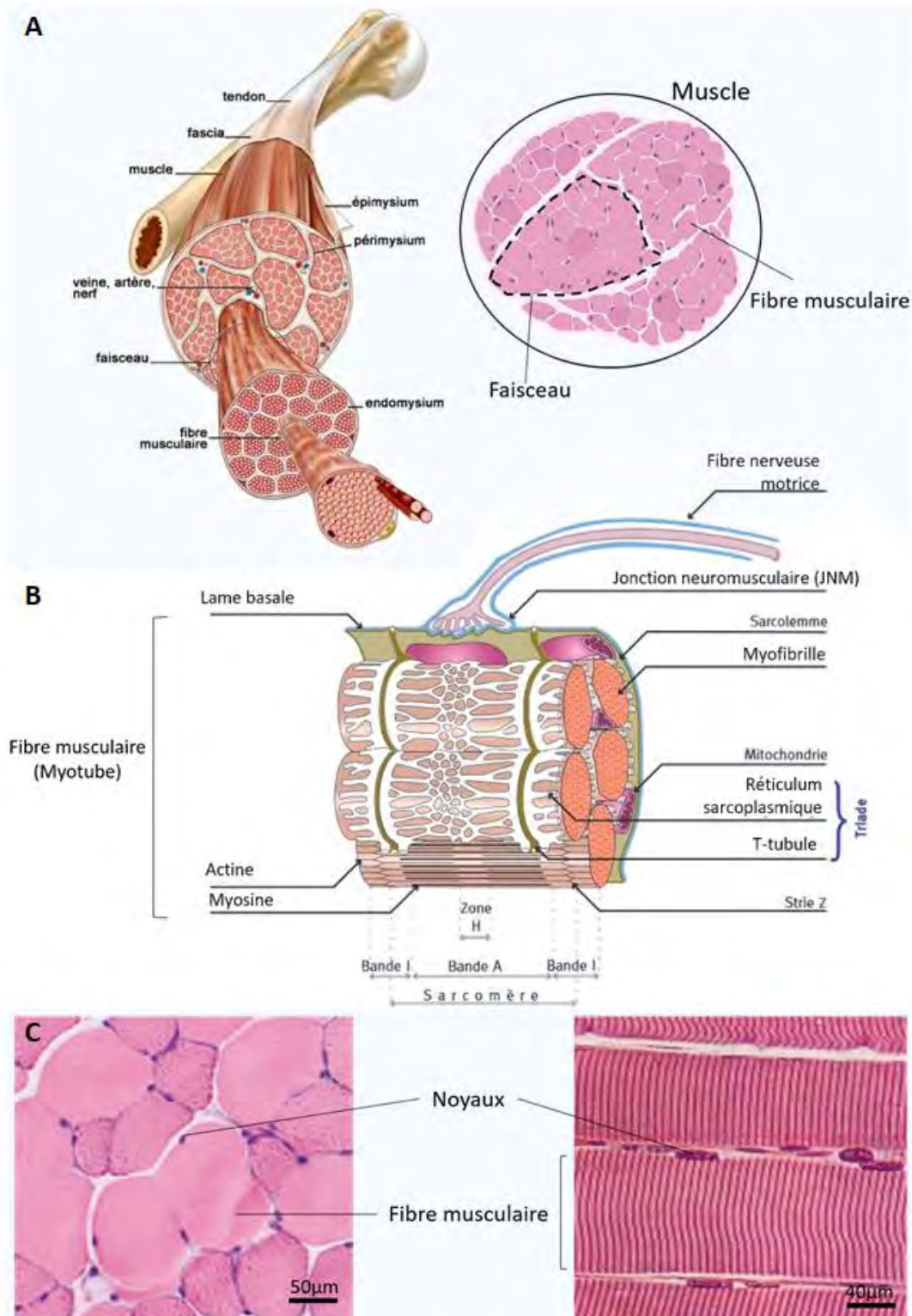


Figure 20 : Développement et organisation du muscle squelettique. (A) Organisation du muscle en faisceau de fibres musculaires. (B) Organisation d'une fibre musculaire en réseau d'actine et de myosine formant différentes stries. (C) A gauche coupe transversale et à droite coup longitudinal de muscle (coloration hémalum-éosine) présentant les noyaux en périphérie.

La contraction du muscle se fait grâce à la triade constituée d'une invagination du sarcolemme, le tubule transverse ou T-tubule en contact avec deux protubérances du réticulum sarcoplasmique appelées citernes terminales. Suite à un influx nerveux, venant des jonctions neuromusculaires (*NMJ*), les canaux calciques présents le long de ce T-tubule vont s'activer et libérer du calcium dans le sarcoplasme, qui va à son tour activer les canaux calciques présents dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. Cet influx calcique permet d'activer les myofilaments d'actomyosines, qui vont coulisser entre eux, et permettre la contraction du muscle. Ce phénomène est également appelé le couplage de l'excitation-contraction (**Figure 21**).

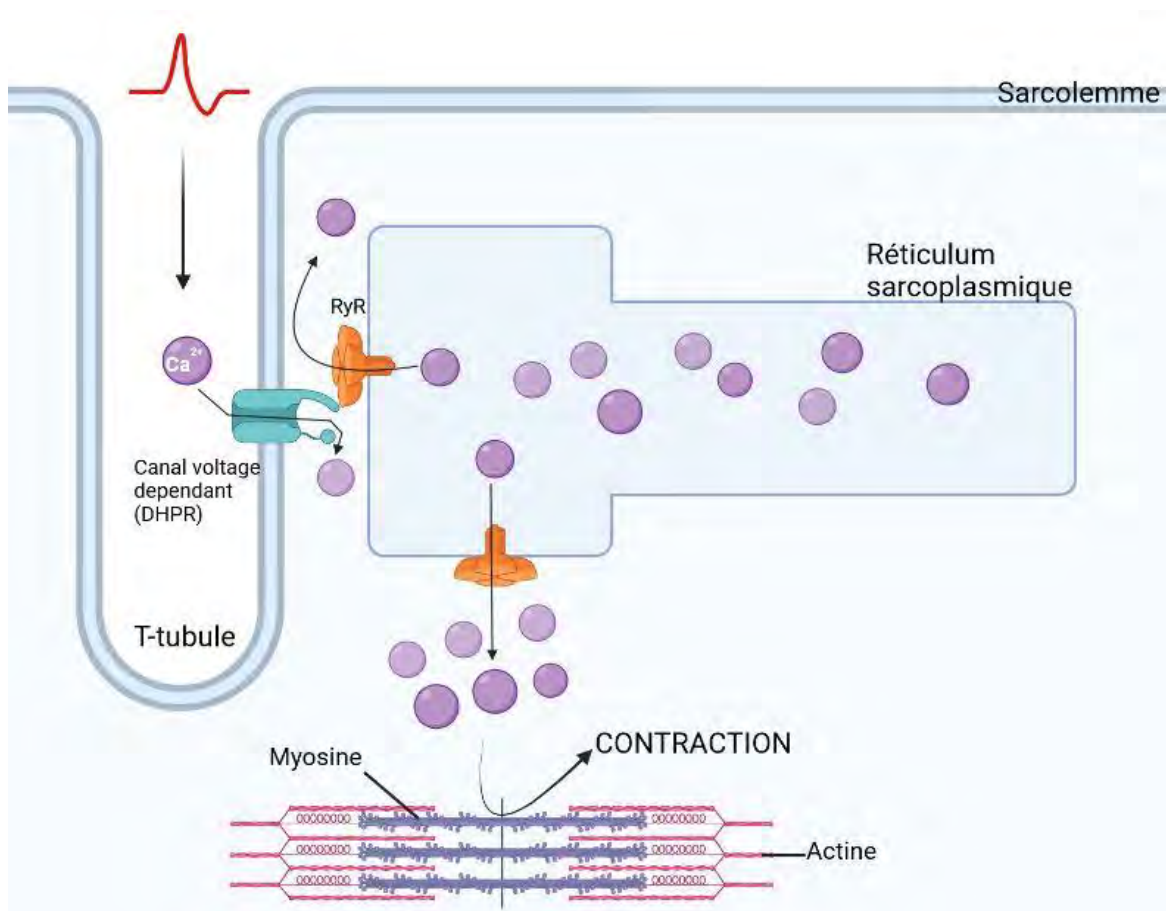


Figure 21 : Couplage excitation-contraction du muscle squelettique. Le sarcolemme est dépolérisé à la suite d'un influx nerveux. Cet influx permet l'ouverture de canaux voltages dépendants au calcium qui vont interagir mécaniquement avec le récepteur à la ryanodine (RyR) situé dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. Le calcium, libéré massivement dans le sarcoplasme, se lie aux filaments de myosine pour les faire coulisser contre les filaments d'actine menant au raccourcissement du muscle et donc à sa contraction.

2.3.2 Caractéristiques du muscle squelettique des patients XLCNM.

De nombreuses études histologiques ont été réalisées sur des biopsies musculaires de patients, permettant de caractériser les défauts au niveau des fibres musculaires. Elles ont permis d'observer plusieurs phénotypes. Les noyaux ont une position internalisée voire centrale dans la majorité des fibres, caractéristique des myopathies centronucléaires. De plus, ces fibres sont hypotrophiées (Gayathri, 2000; Jungbluth et al., 2008) (**Figure 22**).

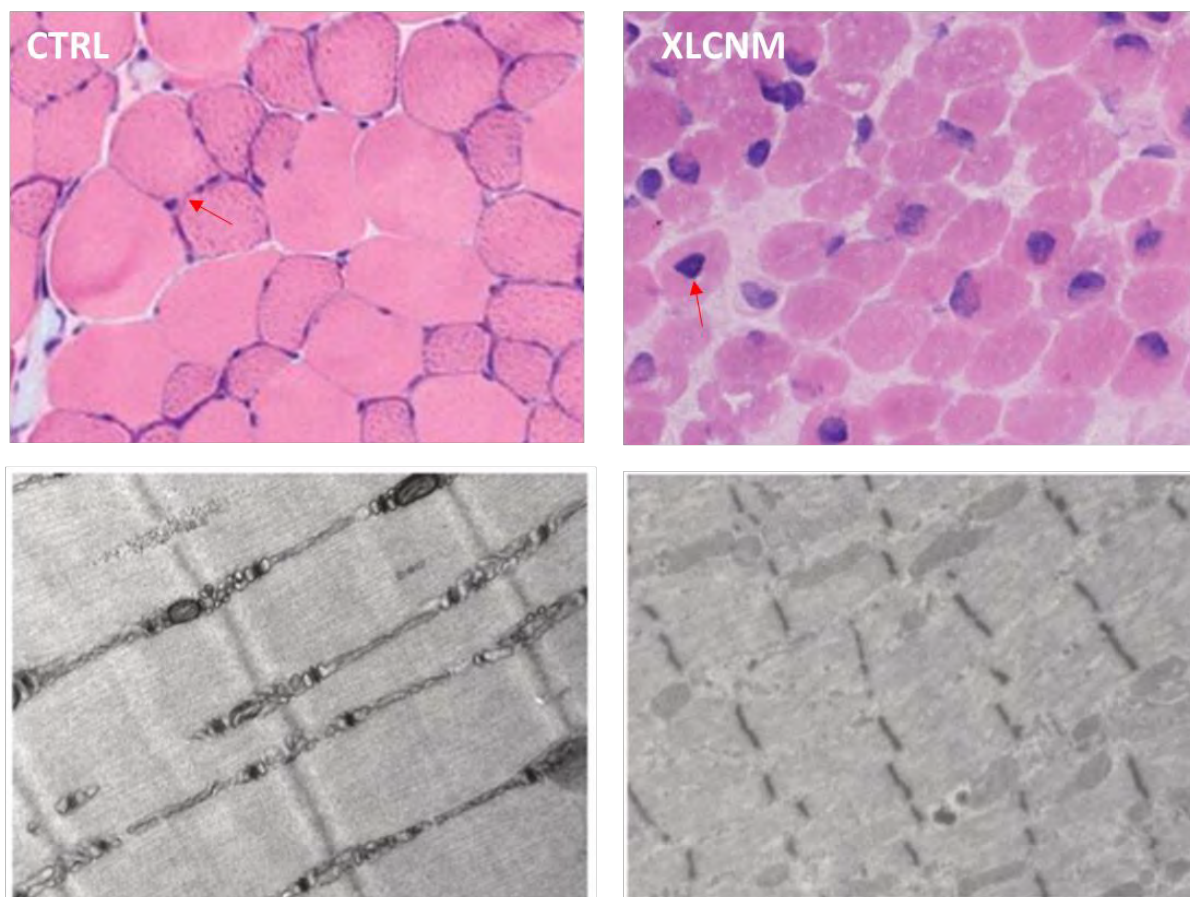


Figure 22 : (Haut) Coupe transversale d'une biopsie musculaire d'enfant contrôle (CTRL) comparée à des patients XLCNM (XLCNM). Coloration hémalun-éosine, montrant des fibres atrophiées (aires des myotubes diminuées) ainsi que des noyaux en position centrale (flèche rouge). (Bas) Coupe longitudinale d'un muscle de souris WT vs MTM1-KO ($Mtm1^{\delta4}/y$) par TEM (transmission electron microscopy) montrant des défauts d'organisation des triades.

Dans les muscles XLCNM l'organisation interne de la fibre est aussi touchée avec un sarcomère désorganisé voire non mature (n'ayant pas atteint la position transversale perpendiculaire au sarcolemme) ressemblant ainsi à celui des myotubes fœtaux. Il est aussi observé une "diffusion/relâchement" de la ligne Z qui semble moins compacte. Les myofibrilles, elles, sont moins nombreuses, en paquet et placées en périphérie de la cellule, laissant un halo dépourvu d'unité contractile au centre. Enfin, ces observations histologiques

et par microscopie électronique montrent que le RE est granuleux et les mitochondries forment des agrégats au centre de la fibre (Gayathri, 2000). Enfin, il est démontré que le muscle des patients XLCNM a une prédominance de fibres à métabolisme oxydatif (Type I) avec une représentation importante des chaînes de myosine de types fœtales/périnatales (MyH8) (Ambler, Neave, & Singer, 1984; Helliwell et al., 1998).

	Muscle XLCNM	Références
Aspect biopsie	Noyaux centraux avec des fibres hypotrophiées	(Ambler, Neave, & Singer, 1984; Ambler, Neave, Tutschka, et al., 1984; Gayathri, 2000; Helliwell et al., 1998; Jungbluth et al., 2008)
Organisation interne	Le sarcolème est désorganisé avec une diffusion de la bande Z	
	Les myofibrilles sont moins nombreuses, en paquet et positionnées en périphérie (halo non-contractile central).	
	Mitochondrie et RE granuleux centraux et en agrégat.	
Type de fibre	Prédominance type I (fœtales/périnatales)	(Helliwell et al., 1998)

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques musculaires observées chez les XLCNM.

2.4. Rôle de MTM1 dans le muscle : étude de l’XLCNM

En dépit d’une expression ubiquitaire, l’absence de MTM1 donne lieu spécifiquement à une atteinte musculaire associée à de multiples phénotypes. L’association de ces phénotypes aux fonctions musculaires de MTM1 chez les patients et les animaux modèles a fait et fait encore l’objet de travaux. De plus, il est à noter que la localisation précise de MTM1 au cours du développement musculaire reste encore inconnue ce qui rend difficile l’association d’une fonction précise de MTM1 à un phénotype musculaire déterminé.

Cependant, des expériences de localisation et de fractionnement des compartiments membranaires dans le muscle squelettique adulte ont permis d’associer MTM1 au réticulum sarcoplasmique (RS) (Amoasii et al., 2013) ou encore aux vésicules endolysosomales dans les

cellules en culture (Ketel et al., 2016). Ces localisations sont en cohérence avec le rôle de PI3-phosphatase de MTM1 qui hydrolyse le PI3P, présent aux endosomes, en PI (Blondeau et al., 2000) et le PI(3,5)P₂, présent aux endosomes tardifs, en PI5P (Tsujiita et al., 2004). A noter que dans des modèles *In vivo*, *mtm1*-KO poisson zèbre (Dowling et al., 2009) et de souris (Amoasii et al., 2012) une augmentation du PI3P a aussi été retrouvée.

2.4.1 Hypothèse de l'arrêt de maturation.

Les fibres musculaires de patients XLCNM ont souvent été comparées avec des fibres fœtales mais il existe différents points de vue sur la maturation, ou non, des myofibres. Dans un premier temps, l'idée d'un arrêt de la maturation de la fibre musculaire a fait échos d'où la nomination de la pathologie « Myopathie Myotubulaire » due à la présence de myotubes au lieu de myofibres. En effet, la présence d'une grande quantité de desmine, de vimentine et de la forme embryonnaire de la myosine Myh8, caractéristique du développement musculaire (Helliwell et al., 1998; Sarnat, 1990) souligne l'aspect immature de la fibre musculaire. D'après Sarnat et ses collaborateurs (1990), l'arrêt de la myogenèse viendrait d'une haute concentration en vimentine et desmine empêchant la migration du noyau en position périphérique. Selon Gayathri en 2000 et Fidziańska et al (1994) ce phénotype pourrait être dû à un défaut du flux nerveux dans les premiers stades de développement fœtaux (Fidziańska et al., 1994; Gayathri, 2000). Ce défaut serait la conséquence de la présence de noyaux centraux, d'une faible taille des fibres et de la prédominance des fibres de type 1. En effet, il est connu que même si les myoblastes peuvent se transformer en myotubes indépendamment de l'innervation en culture cellulaire, l'innervation permet de contrôler la contraction, la taille des fibres, l'organisation des myofibrilles et par conséquent l'emplacement des noyaux en position périphérique sous-sarcolemmique. A partir de la même hypothèse Ambler et Neave postulent que les myotubes observés ressemblent à ceux ayant un âge de développement compris entre 15 et 18 semaines : avant la maturation induite par l'innervation musculaire (Ambler, Neave, & Singer, 1984). Cependant l'innervation ne peut être totalement déficiente car les fibres se différencient en type 1 ou même si à moindre nombre en type 2.

En 2002 l'équipe de Buj-Bello (Buj-Bello et al., 2002) a généré le modèle de souris *Mtm1*-KO montrant que dans les premiers stades de développement des muscles ceux-ci ressemblent à des muscles matures normaux avec des noyaux positionnés en périphérie des fibres et la souris est presque asymptomatique. C'est seulement deux à trois semaines après la naissance (fin de la maturation musculaire chez la souris) que les phénotypes musculaires observés chez les patients XLCNM (même nouveau-nés) apparaissent dans le muscle. Même si ces

observations n'ont pas apporté de preuves moléculaires solides, ils démontrent qu'il ne s'agit pas d'un arrêt de la maturation des muscles fœtaux mais un défaut de maintien de l'intégrité du muscle. Corroborant ces observations dans un autre modèle, Ribeiro en 2011 montre que chez la drosophile la fonction de *mtm* (homologue de MTM1/MTMR2 du vertébré) apparaît dispensable pour la myogenèse mais essentiel pour le remodelage, le maintien et la fonction des muscles (Ribeiro et al., 2011).

2.4.2 Le rôle dans la transduction du signal

Le rôle de la jonction neuromusculaire.

Les observations de la morphologie de la jonction neuromusculaire (NMJ) dans le muscle de patients XLCNM ou les modèles animaux ont montré un aspect immature et une diminution du contact axone-fibres. Des protéines telle que NCAM qui normalement disparaissent lors du développement de ces NMJ, restent présentes le long des fibres (Fidziańska et al., 1994). De plus, les invaginations du sarcolemme permettant la conversion des signaux nerveux (les T-tubules), sont peu nombreuses, peu profondes et mal développées (Ambler, Neave, & Singer, 1984).

Cependant afin de vérifier le défaut de l'innervation musculaire, l'équipe de A. Buj-Bello montre qu'une délétion conditionnelle de *Mtm1* dans le muscle squelettique (45% de diminution de la myotubularine) est suffisant et nécessaire pour conduire aux phénotypes de XLCNM (Buj-Bello et al., 2002). Plus tard en 2012 un travail de Joubert et Buj-Bello 2012 montre que la délétion musculaire de MTM1 dans le muscle adulte provoque l'apparition de certains phénotypes importants de la pathologie. Ces observations suggèrent que la myotubularine est aussi essentielle au fonctionnement et à l'intégrité du muscle adulte. Enfin, bien que les NMJ immatures semblent fœtales chez les modèles XLCNM, l'équipe de Dowling en 2009 montre dans un modèle de Zebrafish *Mtm1*-KO que l'innervation est fonctionnelle bien que présentant un défaut d'excitation-contraction au niveau des T-Tubules (Dowling et al., 2009). Un autre travail en 2012 de la même équipe montre que les NMJs de souris knock-in *Mtm1*-R69C (mutation décrite chez les patients XLCNM) montrent une simplification des jonctions post-synaptiques, un sarcoplasme sous-jonctionnel désorganisé et vacuolaire. Ainsi, les auteurs formulent l'hypothèse d'un défaut de recyclage des récepteurs à la membrane plasmique, menant à la déformation/simplification de la jonction (Dowling et al., 2012) (**Figure 23**).

Le turnover du calcium dans le muscle

Les observations montrant des défauts des NMJs et de couplages excitation-contraction associés à des défauts morphologiques des triades ont mené vers l'exploration de la signalisation calcique dans les modèle XLCNM.

Comme précédemment expliqué dans les rôles du $PI(3,5)P_2$, l'étude de Shen et al en 2009 avait démontré un lien entre ce PI et le canal calcique RyR1 dans le muscle de souris MTMR 14/Jumpy-KO. Les auteurs révèlent une liaison directe du $PI(3,5)P_2$ aux récepteurs RyR1 permettant de contrôler son ouverture. Dans ce modèle il y a donc une fuite spontanée de calcium du réticulum sarcoplasmique (RS) (J. Shen et al., 2009). Une étude de Bachmann et al, 2017 montre que dans les muscles squelettiques de souris Mtm1-KO le récepteur au calcium RyR1 a une expression diminuée. Ils suggèrent l'hypothèse qu'un surplus du $PI(3,5)P_2$ dans les fibres musculaires Mtm1-KO auraient un rétrocontrôle négatif sur l'expression du RyR1 afin de baisser le relargage du Ca^{2+} par le RS. A l'opposé de ces constats, l'étude du Kutchukian et al en 2016, montre dans le muscle de souris Mtm1-KO un relargage du calcium du RS est 60% plus faible, plus lent et plus tardif après une stimulation électrique (Kutchukian et al., 2016) (**Figure 23**).

En dépit de ces observations les mécanismes d'action de MTM1 et de ces substrats sur la morphologie et la fonction de l'appareil de l'excitation contraction reste encore à déterminer. Cependant, et en vue de certaines démonstrations, il est fort possible que les défauts de cette machinerie interviendraient dans la physiopathologie de XLCNM.

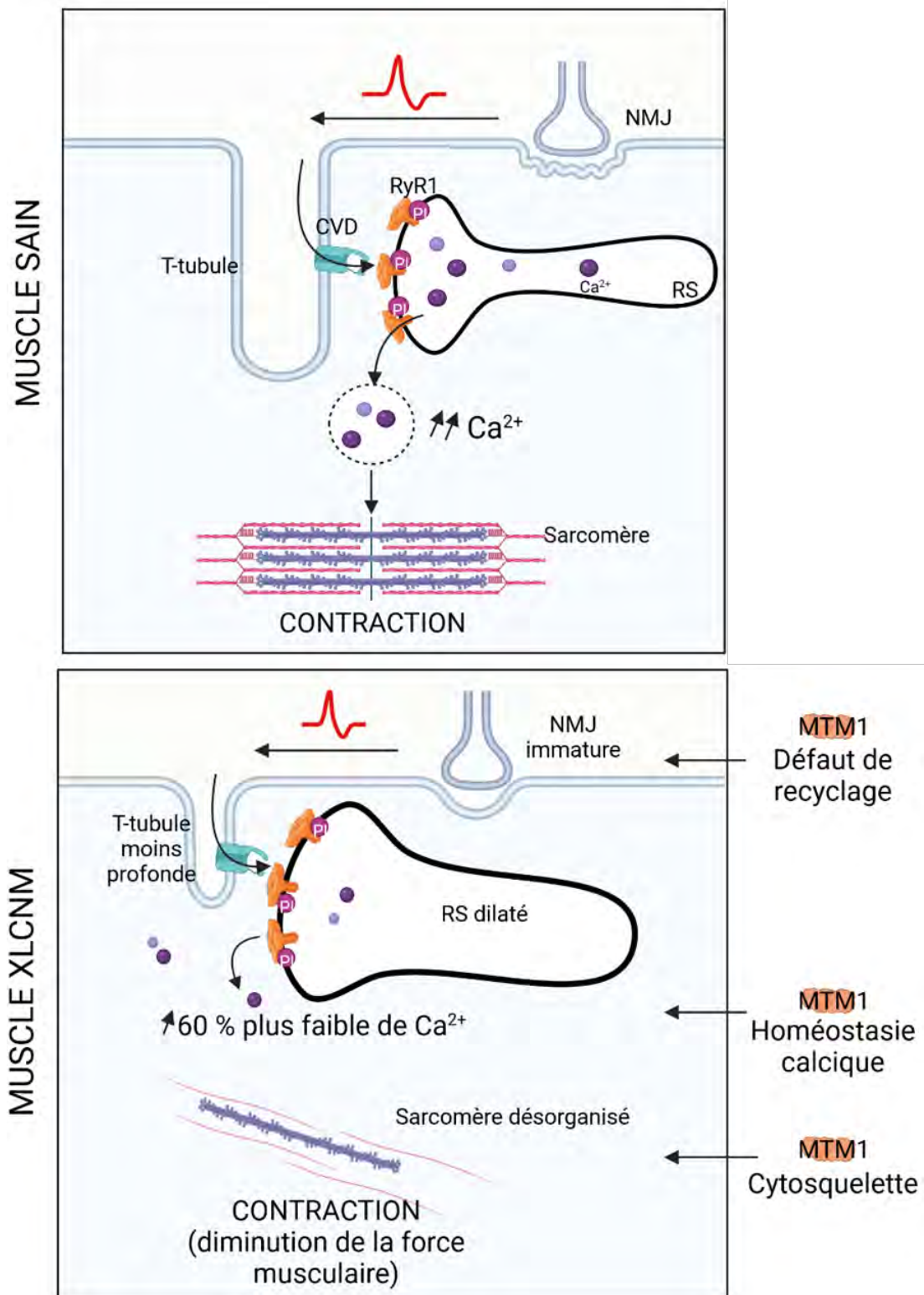


Figure 23 : Rôle de Mtm1 dans la fonction musculaire. La bibliographie montre un défaut de la maturation des JNM, de l'homéostasie calcique ainsi que de l'organisation des éléments constituant le muscle, dans les modèles Mtm1-KO.

2.4.3 Le rôle dans le recyclage et le remodelage membranaire

Comme énoncé précédemment, MTM1 semble jouer un rôle dans le recyclage grâce notamment à une cascade de conversion du PI3P en PI4P pour déterminer l'identité des endosomes de recyclage. Ainsi un défaut de recyclage de l'homologue de la β 1-intégrin a été mis en évidence pour la première fois dans le modèle drosophile *mtm1-ko*. L'absence de MTM1 induit une accumulation vacuolaire de la β 1-intégrin musculaire impactant ainsi son turnover (Ribeiro et al., 2011). Par la suite ce phénotype a été aussi observé dans le muscle de patients XLCNM avec une accumulation sous-membranaire de la β 1-intégrine (Ketel et al., 2016). Du fait du rôle connu des intégrines dans l'adhésion et la mécano-transduction ces travaux ont mis l'accent sur le lien entre cette fonction de Mtm1 et un mauvais attachement des muscles associés à une désorganisation des myofibrilles (Ribeiro et al., 2011).

Ce défaut de recyclage peut mener à des problèmes de remodelage comme théorisé précédemment par Dowling et al, dans leur travail paru en 2012 sur les défauts de la JNM (Dowling et al., 2012). Buj-Bello et ses collaborateurs en 2008 montrent que la surexpression ectopique de Mtm1 par un AAV (*adeno associated virus*) dans le muscle squelettique de souris WT mène à une accumulation de membrane sous la région sarcoplasmique, soulignant un rôle de MTM1 dans le remodelage de la membrane (Buj-Bello et al., 2008). De même une surexpression artificielle de MTM1 aux endosomes Rab5 positif induit une tubulation du système endosomal suggérant que MTM1 a un impact sur le remodelage membranaire liée à la fonction du PI3P (Fili et al., 2006).

2.4.4 Le rôle dans la dégradation

La régulation du cytosquelette et le protéasome.

En 2005, une étude de Noguchi et al (Noguchi et al., 2005) compare l'expression de plus de 4200 gènes dans le muscle squelettique de patients XLCNM grâce à un cDNA microarray. Les résultats montrent une surexpression de gènes impliqués dans le cytosquelette d'actine tels que MARCKS, CFL1, GSN, PFN1, PFN2, TAGLN, ACTR3 et PHACTR4. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans le remodelage des filaments d'actine ou encore la stabilisation de l'actine globulaire. Les auteurs émettent l'hypothèse que la myotubularine pourrait être un régulateur du remodelage du cytosquelette d'actine et pourrait aussi impacter le désassemblage de l'actine. Le tout menant à des problèmes de remodelage de la morphologie cellulaire et une mauvaise distribution des organelles comme observé dans la pathologie. Étant cela, un rôle de MTM1 dans le remodelage du cytosquelette a été proposé par Hnia et

al en 2011. Cette étude révèle une interaction de MTM1 avec la Desmine. MTM1 forme un complexe avec la Desmine grâce à son domaine RID, et cette interaction semble ne pas impacter son activité catalytique. En plus d'un problème de cytosquelette, cette étude met en avant la nécessité de la présence de MTM1 dans le positionnement et l'homéostasie des mitochondries (Hnia et al., 2011). En 2018 un continuum de ces observations montre que MTM1 de concert avec UBQLN2 (*Ubiquiline 2*) permet de guider les protéines mal repliées notamment la Desmine vers le protéasome et ainsi préserver la formation d'agrégats de cytosquelettes toxiques pour la cellule musculaire (Gavriilidis et al., 2018). Ces études permettent de conclure qu'à travers ce lien avec le système ubiquitin protéasome, MTM1 a un rôle important dans la préservation d'un pool fonctionnel de filaments intermédiaires dans le muscle adulte lors des cycles de contraction-relaxation.

L'autophagie

L'autophagie est cruciale pour le développement et la régénération musculaire, et une autophagie aberrante a été reportée dans de nombreuses myopathies (Levine & Kroemer, 2008). Pour expliquer l'importance de ce processus nous pouvons citer les modèles de souris mutés dans le flux autophagique et montrant de graves modifications musculaires. Le modèle de souris délétée dans le muscle de Atg7 ($Atg7^{flox/flox}$ MYL1-Cre (*Myosin light chain 1*)) montre une profonde atrophie musculaire. Le muscle de ces souris montre une accumulation anormale de mitochondries, une distension du réticulum sarcoplasmique, une désorganisation du sarcomère et une formation aberrante de structures membranaires (Masiero et al., 2009). A noter que la délétion de Atg5 dans le muscle squelettique de la souris ($Atg5^{flox/flox}$; HSA-Cre (*human skeletal actin promoter*)) entraîne aussi un phénotype atrophique (Raben et al., 2008). Les auteurs montrent aussi que l'accumulation des substrats autophagiques tels que p62 ou des protéines ubiquitinylées se retrouve particulièrement dans les fibres musculaires rapides et non celles à contraction lente indiquant peut-être une nécessité de l'autophagie dans ces fibres. Enfin, les auteurs retrouvent une distribution des lysosomes altérée et une architecture défaillante du réseau des microtubules.

Les travaux entrepris pour établir un lien entre MTM1 et l'autophagie se basent sur le fait que les deux substrats de MTM1 ont un rôle dans l'autophagie : Le PI3P dans les stades précoces et tardifs de l'autophagie et le PI(3,5)P₂ dans la fusion lysosomal et la dégradation. Enfin, il a été proposé récemment que le produit de MTM1, le PI5P, pourrait remplacer le PI3P dans le processus autophagique lors d'une privation en glucose (Vicinanza et al., 2015).

En 2013, Fetalvero et ses collaborateurs utilisent une souris Mtm1-KO (Mtm1^{gt/y}, délétion de l'exon 1 obtenue par la stratégie gene-Trap) et montrent une accumulation de LC3-II, de p62 (des marqueurs de l'autophagie tardive) et de Lamp2 (un marqueur lysosomal). Les auteurs proposent que l'absence de MTM1 provoque un blocage de l'autophagie dans les stades tardifs qui n'est pas observé dans d'autres tissus que dans le muscle squelettique. De plus, soumis à une privation nutritionnelle, le muscle de souris montre une conversion seulement partielle du LC3-I en LC3-II suggérant ainsi que l'autophagie induite est aussi défaillante (Fetalvero et al., 2013). La même année, utilisant l'autre modèle le plus communément utilisé Mtm1-KO (délétion de l'exon 4), Al-Qusairi et al montrent aussi une diminution du flux autophagique avec une accumulation d'autophagosomes et du marqueur p62 (Al-Qusairi et al., 2013). Les deux études ont essayé d'explorer les voies menant à ces défauts d'autophagie. L'autophagie est régulée par deux grandes voies de signalisation. La première ayant pour protéine finale FOXO3 qui est un facteur de transcription stimulant la dégradation par le protéasome et l'autophagie. La deuxième étant la voie passant par mTOR, une kinase qui stimule la croissance cellulaire et inhibe l'autophagie. Dans les deux études nous trouvons une augmentation de la phosphorylation des effecteurs de mTOR (Fetalvero et al., 2013) et de mTOR^{Ser2448} (Al-Qusairi et al., 2013) et une hypophosphorylation de FOXO3^{Ser318/321} dans le muscle Mtm1-KO. Suite à un test d'inhibition de l'activité mTOR par des inhibiteurs pharmacologiques (AZD8055 - inhibiteur ATP compétitif de mTOR), Fetalvero et al, concluent que dans des souris Mtm1^{gt/y} la dérégulation de l'autophagie est probablement la conséquence de la dérégulation de la voie mTORC1.

MTM1 semble donc jouer de nombreux rôles dans la cellule musculaire et est indispensable au maintien de l'intégrité et des fonctions musculaires. Ces rôles sont :

- 1) Les défauts de l'homéostasie calcique importants dans les cellules musculaires au vu de leur mode de fonctionnement particulier (la contraction et le cross talk avec l'innervation).
- 2) Le rôle suggéré du PI3P dans le recyclage de l'intégrine.
- 3) La dérégulation de l'axe mTORC1-autophagie.
- 4) La démonstration de l'implication de MTM1 dans le turnover des filaments intermédiaires. Ces processus de contrôle qualité servent aussi de sources pour recycler des acides aminés et à l'épuration de protéines et organelles dysfonctionnels pour préserver la cellule musculaire.

2.5. Thérapie.

Actuellement il n'y a pas de thérapie efficace disponible dans le traitement de XLCNM ni des autres CNMs. Cependant il existe plusieurs pistes thérapeutiques en cours d'étude telles que la thérapie génique, l'enzymothérapie, la normalisation du signalment MTM1 ... Mais ne donnant, pour le moment, que peu de résultats.

2.5.1 La thérapie génique.

Le but de la thérapie génique est de réintroduire dans l'organisme le gène manquant. Cette stratégie est intéressante dans le cadre de la pathologie XLCNM puisque MTM1 est un gène relativement petit (3,5 kb). Il est donc possible de le réintroduire via un vecteur viral inactif sous promoteur musculaire (desmine). Cette stratégie a été mise en place et largement explorée par l'équipe de Buj-Bello sur plusieurs modèles de XLCNM et plus récemment appliquée chez l'homme dans le cadre d'un essai thérapeutique (NCT03199469) conduit par la société Autent therapeutics (USA) et le Généthon (Paris). De 2014 à 2017 l'équipe de Buj-Bello démontre dans des modèles murins et canins que cette stratégie améliore la masse musculaire, la force musculaire, le phénotype histologique du muscle et aussi la survie, seulement après une injection. De plus, aucune réaction toxique a été observée (Childers et al., 2014; Elverman et al., 2017). En ce qui concerne les patients XLCNM, la cohorte est composée d'enfants de moins de cinq ans ayant besoin d'assistance respiratoire continue. Les premières injections du vecteur médicament montrent une amélioration du phénotype chez certains patients allant jusqu'à l'indépendance respiratoire d'un des patients seize semaines post-injection. Cependant en 2020 l'étude a été mise sur pause une première fois, puis arrêtée en 2021 suite aux décès de quatre enfants par insuffisance hépatique. Ces enfants avaient des antécédents de maladie hépatobiliaire, trois d'entre eux recevaient la plus haute dose de traitement alors que le dernier recevait une faible dose. Deux hypothèses sont pour le moment mis en avant : l'hépatotoxicité des AAV, le vecteur viral utilisé, est un effet secondaire régulièrement rapporté dans les stratégies de thérapie génique. Une seconde montre un lien établi mais pour le moment inexplicé entre l'XLCNM et une atteinte du foie indépendamment du vecteur viral (Dowling et al., 2002; Jungbluth et al., 2008).

2.5.2 Normalisation des niveaux de MTM1

Enzymothérapie.

Le but de cette stratégie consiste à réintroduire la protéine MTM1 pure dans le muscle squelettique. Une étude pré-clinique montre qu'une faible quantité de MTM1 fonctionnelle est suffisante pour améliorer le phénotype de la pathologie (Childers et al., 2014; Laporte et al., 2001). L'enzymothérapie propose donc de délivrer MTM1 grâce à une injection de la protéine fusionnée avec un domaine lui permettant d'entrer dans les myofibres. A noter que dans d'autres pathologies comme des formes infantiles de la maladie de Pompe avec un déficit en alpha-glucosidase acide, l'utilisation de cette approche (le traitement Myozyme™) a montré des résultats très prometteurs.

Sur un plan fonctionnel, l'étude montre une amélioration modérée de la contraction musculaire, du positionnement des triades et des T-tubules dans les souris Mtm1-KO traitées. Cependant l'histologie des muscles ne montre pas d'amélioration de l'atrophie. De plus, la nécessité des doses répétées pourrait induire une réponse immune. Une étude pré-clinique devrait être mise en place dans les prochaines années par Valerion Therapeutics.

Expression de MTMR2.

Cette stratégie prend source du constat que MTM1 et son homologue MTMR2 partagent 65% de leur séquence d'acides aminés. L'idée est donc d'administrer par intraveineuse une dose de MTMR2 dans un vecteur viral. Chez des souris Mtm1-KO, cette stratégie montre une augmentation de l'activité motrice, de la force du muscle et d'une survie plus importante au cours d'une étude de 3 mois. Cette stratégie montre cependant les mêmes désavantages que la thérapie génique par Mtm1 mais permet d'éviter une potentielle réponse immunitaire liée à un ajout d'une protéine exogène (MTM1) absente chez les patients XLCNM (Danièle et al., 2018; Raess et al., 2017).

2.5.3 Autres stratégies.

Régulation du PI3P.

Dans la XLCNM l'absence de MTM1 mène à l'accumulation de PI3P dans les cellules musculaires (Sabha et al., 2016). Une des stratégies proposées est de contrebalancer le niveau trop élevé de PI3P. Pour cela l'idée est d'inhiber les kinases responsables de la synthèse du PI3P : PI3K de classe 2 et de classe 3 (Vps34). Chez la souris MTM1-KO, l'inactivation combinée de PI3KC2β (Sabha et al., 2016) est viable et permet l'augmentation de la survie,

augmente le poids du corps ainsi que la force et restaure l'histologie des muscles. De façon surprenante, la diminution de Vps34 dans les souris Mtm1-KO empire le phénotype.

D'un point de vue fondamental, cette expérience a permis de montrer que la PI3KC2 β et MTM1 agissent sur le même pool de PI3P. D'un point de vue pharmacologique cela montre que bloquer l'activité de la PI3KC2 β pourrait être une stratégie thérapeutique dans les patients XLCNM, cependant pour le moment il n'existe pas d'inhibiteur spécifique avec une activité in vivo validée ciblant cette kinase.

Oligonucléotides antisens dirigés contre la dynamine II.

La dynamine 2 est codée par *Dnm2*, un gène muté dans les formes dominantes de CNM. Cette GTPase est liée aux microtubules et à des protéines qui lient l'actine ainsi que d'autres protéines du cytosquelette. Il a été montré que la dynamine 2 est surexprimée dans les muscles squelettiques des souris Mtm1-KO. Lors d'un croisement d'une souris MTM1-KO avec une souris hétérozygote *Dnm2*^{-/+} Cowling et collaborateurs, observent une amélioration du phénotype XLCNM (force, survie et paramètres histologiques) (Cowling et al., 2014). En 2017, la même équipe teste alors un traitement via un oligonucléotide antisens (ASO) dirigé contre *Dnm2* dans des souris Mtm1-KO (Tasfaout et al., 2018) montrant des résultats prometteurs. Cependant les mécanismes et possibles interactions entre la dynamine 2 et la myotubularine sont encore totalement inconnus.

Tamoxifène.

Dans les souris Mtm1-KO un traitement au tamoxifène, un régulateur des récepteurs aux oestrogènes, permet aussi d'améliorer le phénotype d'XLCNM. Le traitement permet d'augmenter la survie, les fonctions motrices et permet de diminuer les marqueurs histologiques de la pathologie (Gayi et al., 2018). L'hypothèse est que ce traitement semble normaliser les niveaux de dynamine 2 et de PI3KC2 β par un mécanisme non identifié. Cependant les souris traitées développent des atteintes hépatiques graves et succombent après quelques semaines de traitement. Enfin l'action du tamoxifène et sa répercussion sur le muscle squelettique sur le long terme n'est pas bien établie.

Chapitre 3. mTORC1 et les PIs: lien dans la myopathie centronucléaire lié à l’X.

La découverte de mTOR est une avancée majeure pour la communauté scientifique. Historiquement, en 1964 une expédition canadienne dirigée par Suren Sehgal à l’Île de Pâques, collecte des échantillons de sol dans le but de trouver des agents antimicrobiens. Il s’avère que les bactéries isolées, lors de ces recherches, produisent un composant avec des propriétés antifongiques, immunosuppressives, anti-tumorigènes et neuroprotectrices (Eng et al., 1984; Houchens et al., 1983; Martel et al., 1977; Vézina et al., 1975). Ce composé est nommé rapamycine en référence à Rapa Nui, le nom indigène de l’île de Pâques. A partir de ce moment de nombreux scientifiques, par diverses méthodes, cherchent la cible du complexe rapamycine, jusqu’en 1994 avec la découverte de sa protéine cible : une kinase qui sera appelée mTOR pour mechanistic Target Of Rapamycine (Brown et al., 1994; Sabatini et al., 1994).

Comme attendu au vu du nombre d'applications de la rapamycine, mTOR est une protéine kinase au carrefour de nombreuses voies de signalisation majeures. Cette protéine est importante dans l’organisation cellulaire et la physiologie de tous les eucaryotes. Les études montrent que mTOR est un nœud signalétique qui contrôle la croissance cellulaire ainsi que l’autophagie. En tant que telle, elle intègre des informations sur la disponibilité d’énergie et de nutriments pour permettre de coordonner la synthèse (anabolisme) ou la dégradation (catabolisme) de composants cellulaires tels que les protéines, les lipides, les sucres, etc...

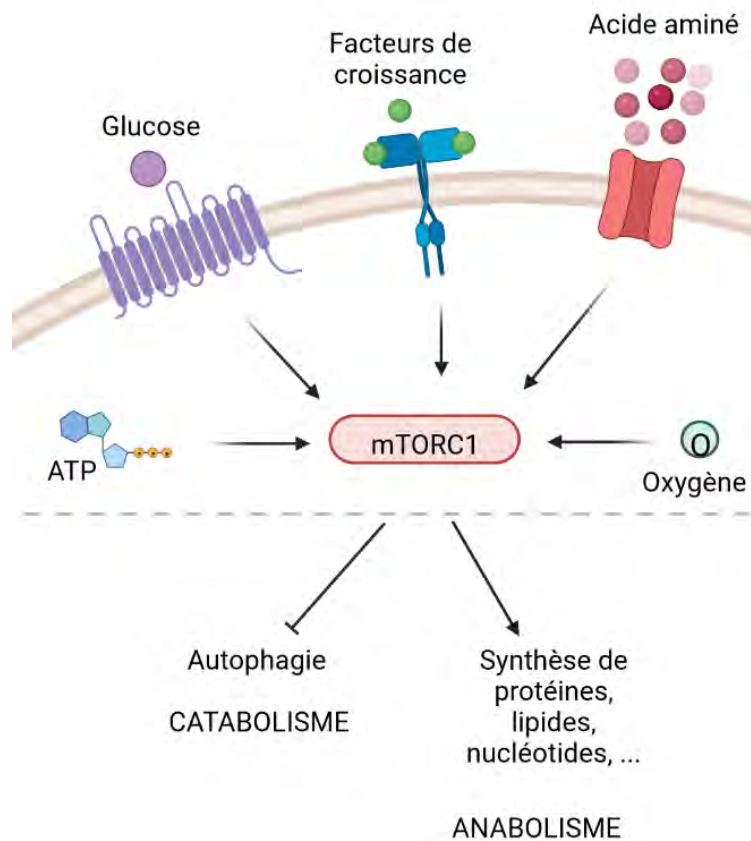


Figure 24 : La voie mTORC1. mTORC1 est un complexe protéique intégrant de nombreux signaux tels que la disponibilité en facteurs de croissance, acides aminé ou énergie afin de maintenir une balance entre catabolisme (dégradation via l'autophagie) et l'anabolisme (synthèse de protéines et de biomasse : lipides, nucléotides, ...)

La dérégulation de cette voie fondamentale perturbe l'homéostasie cellulaire et est associée à la croissance tumorale, à des pathologies liées au vieillissement et des dérégulations du métabolisme.

De nombreuses revues expliquent en détail le fonctionnement et les régulations de la voie mTORC1. La dernière revue très complète est : Liu, Grace Y ; Sabatini, David M. (2020). *mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Liu & Sabatini, 2020).

3.1 L'architecture de mTOR.

mTOR est une sérine-thréonine kinase atypique de 289 kDa. Elle existe dans deux complexes, nommés mTOR complexe 1 (mTORC1) et mTOR complexe 2 (mTORC2). Ces deux complexes sont différents par leur composition protéique, leur sensibilité à la Rapamycine et leurs fonctions cellulaires.

Les partenaires de mTOR dans le complexe corps mTORC1 sont Raptor (*Regulatory associated protein of mTOR*), mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8*), PRAS40 (*Proline rich Akt substrate 40 kDa*) et Deptor (*DEP domain containing mTOR interacting protein*). Tout d'abord Raptor, est une protéine qui est essentielle à la localisation de mTORC1 et qui facilite le recrutement des substrats de mTORC1 (D.-H. Kim et al., 2003; Schalm et al., 2003). C'est aussi Raptor qui lie PRAS40 qui est un inhibiteur endogène de mTOR (Sancak et al., 2007). Ensuite mLST8, à travers son association au domaine catalytique de mTORC1, permet de stabiliser son activité kinase (D.-H. Kim et al., 2003; Yang et al., 2013). Pour finir, Deptor est comme PRAS40 un inhibiteur du complexe mTORC1 (Peterson et al., 2009).

Les études de cristallographie ont montré que mTORC1 se dimérise grâce au domaine contenant des répétitions HEAT et au niveau de l'interface entre mTOR et Raptor (Aylett et al., 2016; Yip et al., 2010). De plus, ces études ont montré que mTORC1 seul est inactif, c'est en présence d'un activateur important : la GTPase Rheb, que le site catalytique de mTOR bascule en mode actif (Yang et al., 2017).

Les partenaires de mTOR dans le complexe corps mTORC2 sont : mLST8 et Rictor (Sarbasov et al., 2006), un homologue de Raptor qui lie mSIN1 (MAPK-interacting protein 1) (Frias et al., 2006). Ce complexe lie Deptor mais aussi Protor 1/2 (Protein associated with Rictor 1/2) (Pearce et al., 2007). mTORC2 dimérise aussi et sa conformation bloque le site de liaison à la Rapamycine expliquant son insensibilité à celle-ci (Chen et al., 2018; Stutfeld et al., 2018). Cependant une exposition prolongée à la rapamycine permet quand même l'inhibition de ce complexe, puisque la Rapamycine va séquestrer la protéine mTOR diminuant ainsi la formation de nouveaux complexes mTORC2 (Sarbasov et al., 2006) (**Figure 25**).

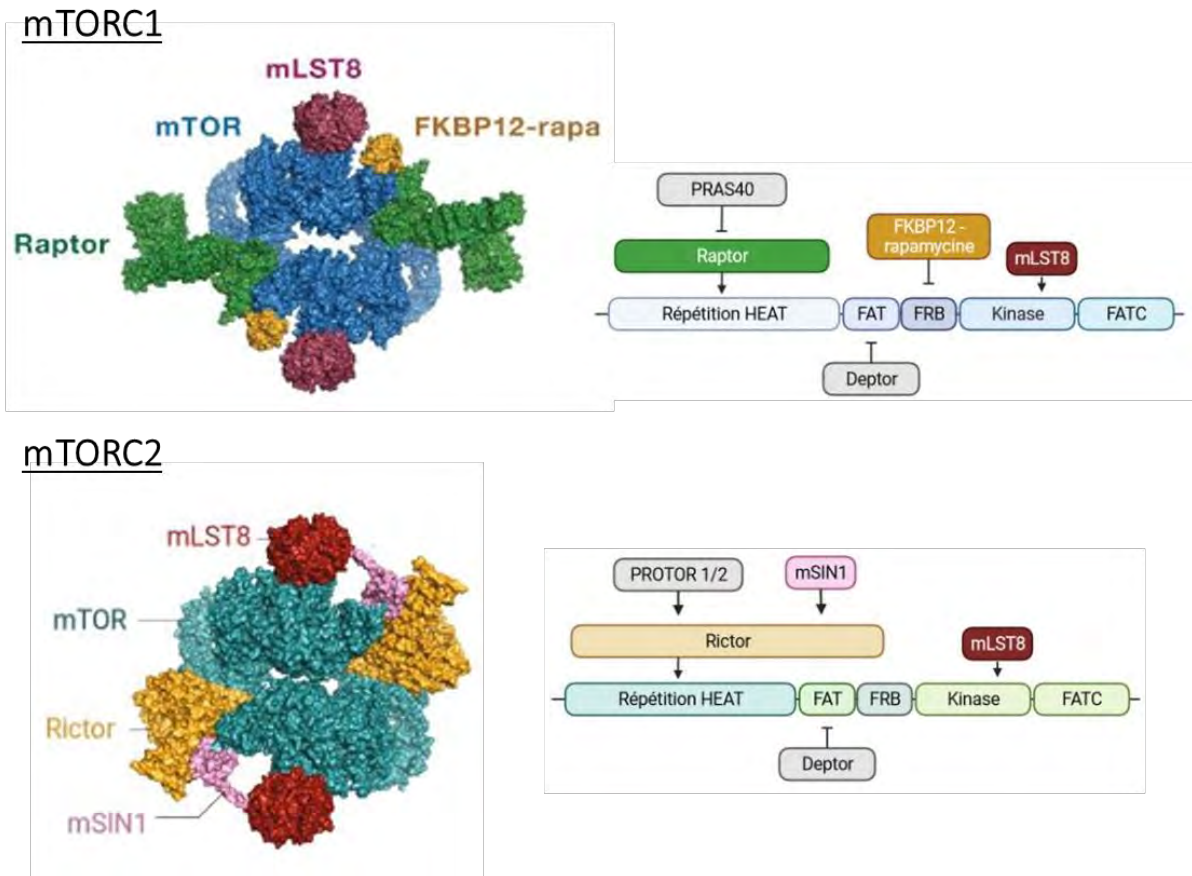


Figure 25 - Structure de mTORC1 et mTORC2 (d'après Sabatini et al, 2020). Les parties de gauche montrent la structure 3D des deux complexes suivis à leur droite de leur domaines protéiques. A noter que mTOR s'homodimérise.

3.2 Les fonctions de mTORC1.

L'activation de mTORC1 permet l'entrée de la cellule en phase de croissance, phase qui est caractérisée par l'augmentation en taille et en nombre des cellules. mTORC1 initie les cascades de biosynthèse de macromolécules (protéines, lipides et acides nucléiques) et la production d'énergie pour garantir une croissance cellulaire tout en limitant les voies cataboliques telle que l'autophagie.

3.2.1 La production de protéines et de biomasse.

Deux substrats clés de mTORC1 dans l'activation de la synthèse protéique sont : S6K (*p70 S6 kinase*) et 4E-BP (*4E-binding protein*). Non-phosphorylée, la protéine 4E-BP séquestre eIF4E (eukaryotic translation initiation factor) et sa phosphorylation par mTORC1 (4E-BP1^{Thr37/46}) libère eIF4E nécessaire à la traduction d'ARN messager (Hara et al., 1997). S6K est une protéine kinase et sa phosphorylation par mTORC1 (S6K^{Thr389}) induit son activité kinase via une multitude d'effecteurs. Ces cibles ont différentes fonctions et peuvent stimuler la

transcription d'ARNm mais aussi la biogenèse des ribosomes requis pour la traduction. Par exemple la protéine S6 un composant de la sous-unité ribosomique 40S (Hannan et al., 2003).

De façon plus directe, mTORC1 permet l'augmentation de la transcription des ARNs ribosomiques et des ARNs de transfert notamment via la phosphorylation de facteurs régulateurs des ARNs polymérase I et III, respectivement. Des facteurs tels que UBF (*upstream binding factor*) (Hannan et al., 2003) ou TIF-1A (*transcription initiation factor*) (Mayer et al., 2004), spécialisés dans la transcription de l'ARN ribosomique sont également des cibles de mTORC1. Il est intéressant de noter que l'inhibition de mTORC1 mène à la diminution de la transcription d'ARN messenger contenant un motif oligo-pyrimidique en 5', de façon 4E-BP dépendant (Thoreen et al., 2012). Ces ARNs à motif sont appelés les TOP-like ARN. La liste des cibles de mTORC1 s'agrandie au fur et à mesure de la découverte de l'implication de mTORC1 dans de nouvelles cascades de signalisation (**Figure 26A**).

L'activation de mTORC1 induit aussi la synthèse des lipides pour soutenir la biogenèse des membranes lors de la croissance et la prolifération cellulaire. mTORC1 permet cette synthèse à travers différents substrats, tel que le facteur de transcription SREBP (*sterol regulatory element binding protein*). Quand les niveaux de stérol sont bas, SREBP se transloque du réticulum endoplasmique vers le noyau où il permet la transcription de gènes impliqués dans la synthèse de-novo de lipides et du cholestérol (Horton et al., 2002). L'activation de mTORC1 promeut ce programme de transcription via l'inhibition de lipin 1 un inhibiteur de SREBP (Peterson et al., 2011). Bien que le mécanisme ne soit pas totalement connu, il semblerait que l'action de SREBP puisse aussi être conduite de façon S6K dépendant.

Pour maintenir la réplication de l'ADN et la synthèse d'ARN, mTORC1 supporte aussi la synthèse de nucléotides toujours via l'activation d'effecteurs tels que S6K et de facteurs de transcription tel que ATF4 (*Activating transcription factor 4*). En plus de son rôle dans la biosynthèse pour la croissance, mTORC1 a un effet sur le métabolisme du glucose en augmentant la synthèse d'enzymes glycolytiques et en favorisant la glycolyse. Enfin, il a aussi un effet sur la synthèse d'énergie sous forme d'ATP via des transcrits mitochondriaux et sur la biogenèse mitochondriale elle-même (Liu & Sabatini, 2020) (**Figure 26B**).

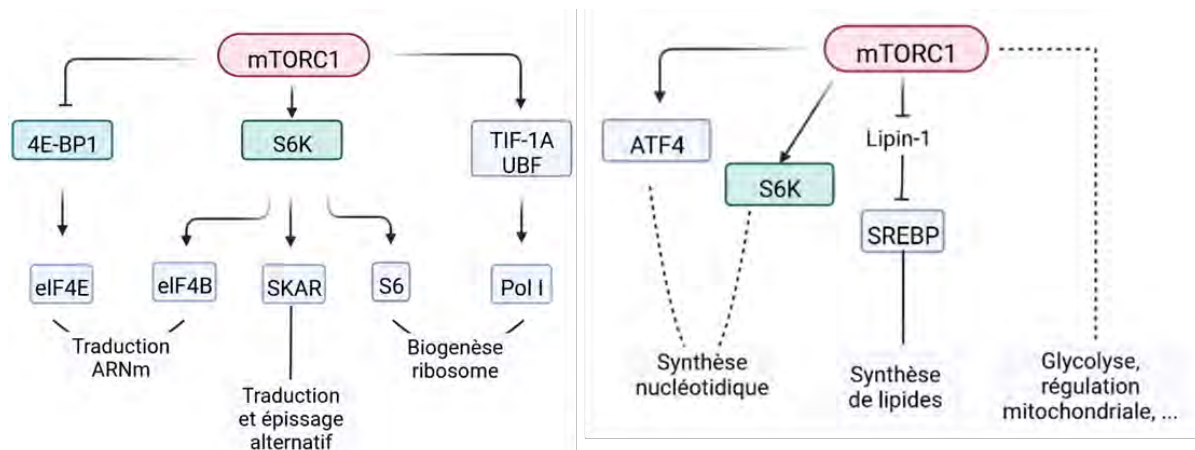


Figure 26 - Production de protéines et de biomasse (lipide, nucléotides) par mTORC1.

3.2.2 La répression du catabolisme et de l'autophagie.

La croissance d'une cellule est régulée comme un cycle. Lorsque les nutriments sont apportés à la cellule en abondance, mTORC1 est activé permettant l'accumulation de protéines et de biomasse. Lors d'une privation nutritionnelle, la cellule bascule vers le catabolisme pour se débarrasser des protéines et des organelles dysfonctionnelles afin de reformer/recycler des ressources. Pour cela mTORC1 est inactivé, la synthèse est donc stoppée et les voies de dégradation s'activent.

Dans les conditions de disponibilité en nutriments, mTORC1 bloque l'autophagie en phosphorylant et inhibant des facteurs impliqués dans l'initiation des autophagosomes comme ULK1 (*unc-51-like autophagy activating kinase 1*) et ATG13 (*autophagy related protein 13*) qui sont impliqués dans l'initiation de la formation des autophagosomes (Ganley et al., 2009). mTORC1 joue aussi sur l'autophagie plus tardive avec, par exemple, la phosphorylation de UVRAG (UV radiation resistance associated gene) permettant d'inhiber la maturation des autophagosomes (Y.-M. Kim et al., 2015). De plus, mTORC1 a un rôle dans la biosynthèse des lysosomes, lorsqu'il est actif il séquestre TFEB dans le cytosol. Si mTORC1 est inactivé alors TFEB est transloqué dans le noyau. Ce facteur permet l'activation de gènes pour la synthèse lysosomale. Ces nouveaux lysosomes dégradent les protéines et relâchent dans le cytoplasme des acides aminés permettant la réactivation de mTORC1. Dans une lignée cellulaire pancréatique Wyant et al, ont montré que l'ablation du transporteur d'acides aminés SLC38A9 bloque les acides aminés à l'intérieur du lysosome et que cela engendre l'inhibition de la voie mTORC1 (Wyant et al., 2017) (Figure 27).

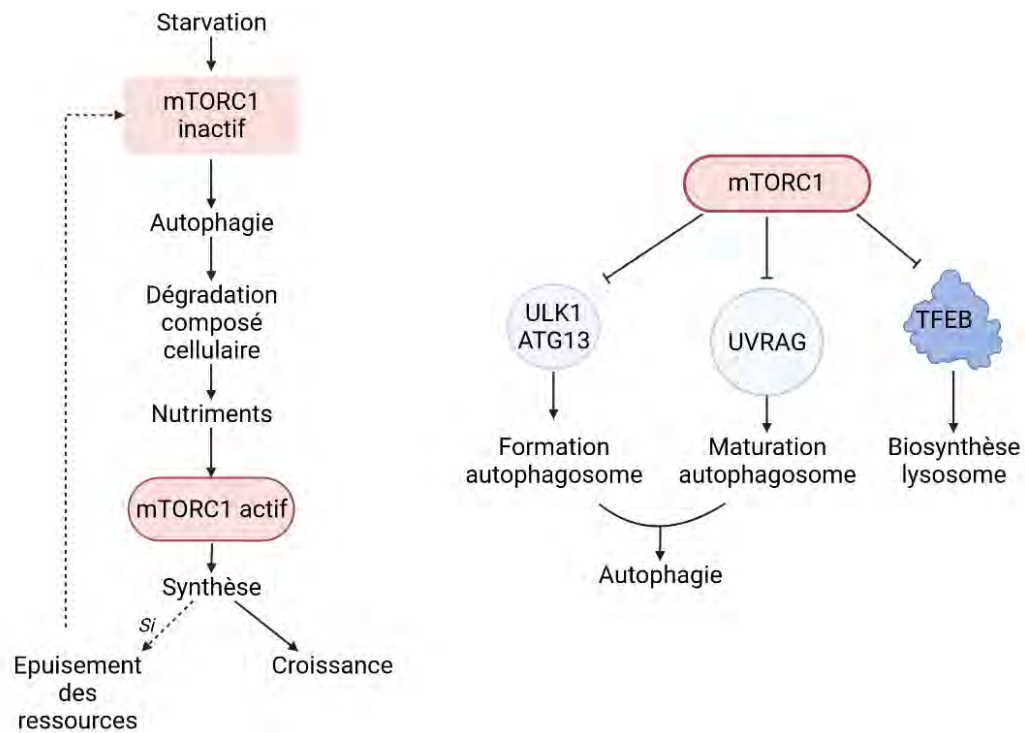


Figure 27 - Répression de l'autophagie par mTORC1

3.3 Régulation de mTORC1.

mTORC1 est un senseur de l'état nutritionnel de la cellule. Il est activé lorsque tous les matériaux : acides aminés, facteurs de croissance et énergie sont disponibles. mTORC1 intègre donc l'ensemble des informations sur leurs disponibilités via différentes voies de signalisation qui permettent son recrutement au lysosome, lieu de son activation (**Figure 28**).

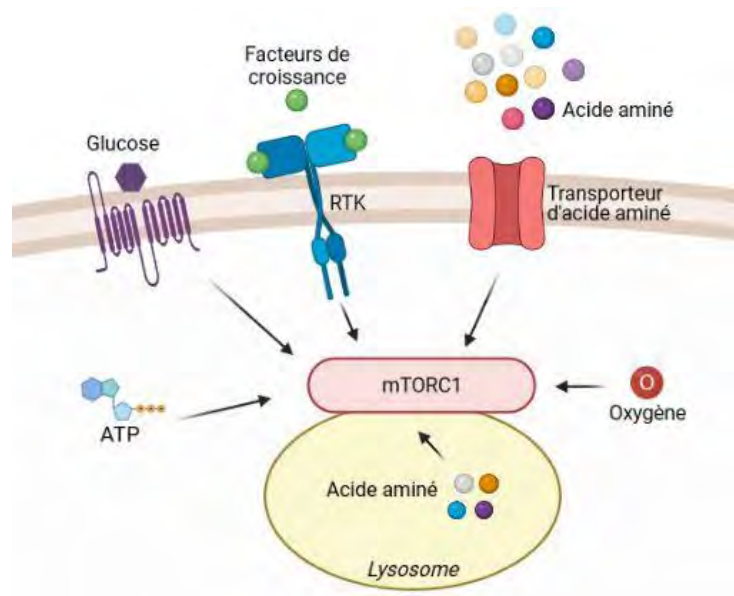


Figure 28 - Régulation de mTORC1.

C'est grâce à la génération d'anticorps dirigés contre mTOR que sa localisation a pu être observée. Lorsque les cellules sont privées de nutriments ou de facteurs de croissance, la majeure partie de mTOR se retrouve dans le cytosol. L'équipe de Sabatini a pu démontrer que lorsque mTOR est activé par les nutriments, il se retrouve à la surface de vésicule Rab7 positive, connue pour marquer les endosomes tardifs/ lysosomes (Sancak et al., 2008).

3.3.1 Les facteurs de croissance.

Le signal des facteurs de croissance et autres mitogènes permet l'activation de cascades en amont de mTORC1. Par exemple l'exposition à l'insuline ou à l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) permet d'activer la voie PI3K-Akt (Garami et al., 2003; Manning et al., 2002). Après une stimulation à l'IGF-1 des PI3K de classe 1 sont activés et permettent la conversion du PI(4,5)P₂ membranaire en PIP₃. Ce PI sert de ligand pour recruter Akt, via son domaine PH. Akt est une protéine kinase qui phosphoryle directement TSC2 un des composants du complexe TSC (Tuberous sclerosis complexe). TSC est un nœud signalétique composé de TSC1, TSC2 et TBC1D7 (Dibble et al., 2012). Le complexe TSC actif est associé à la membrane lysosomale où il séquestre Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), sous sa forme inactive couplée au GDP. Lorsque les signaux de facteurs de croissance inactivent TSC, il est dissocié du lysosome, levant l'inhibition sur Rheb et permettant son activation (Demetriades et al., 2014; Inoki et al., 2003; Menon et al., 2014; Tee et al., 2003).

Pour restaurer la régulation de TSC après un stimulus, le substrat de mTORC1 : S6K phosphoryle directement IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*); ce qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie PI3K-Akt (Harrington et al., 2004).

D'autres voies comme Wnt (Inoki et al., 2006) et TNF (*tumor necrosis factor*) (Lee et al., 2007) semblent être impliquées bien que les mécanismes ne soient pas encore totalement identifiés. Enfin, la voie Ras-Erk (Ma et al., 2005) a aussi été décrite dans l'activation de mTORC1 par les facteurs de croissance. Les voies Akt-PI3K et Ras sont mutées dans de nombreux cancers et la régulation de TSC est souvent perdue dans ce contexte oncogénique ce qui induit une activation constante de mTORC1 même en l'absence de signaux nutritionnels (Figure 29).

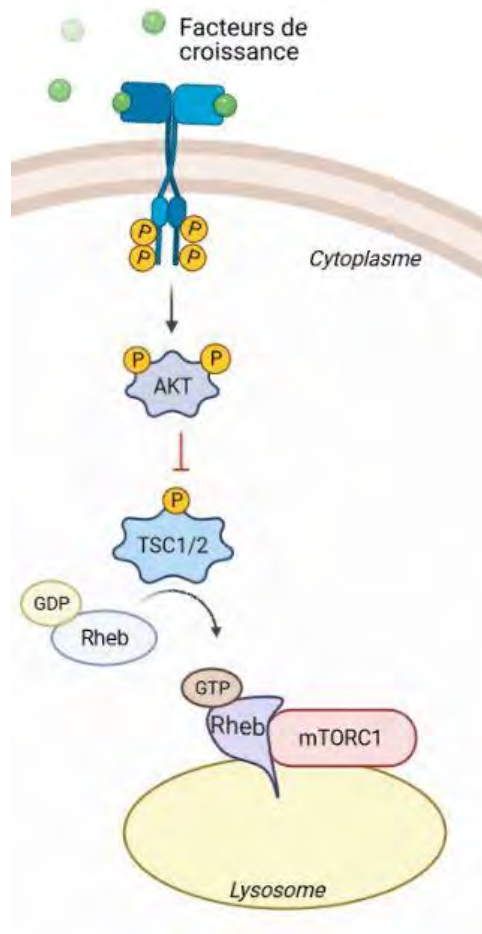


Figure 29 - Activation de mTORC1 par les facteurs de croissance

3.3.2 Les acides aminés et autres nutriments

C'est en 1998 que pour la première fois il a été observé que l'apport des acides aminés en particulier la leucine et l'arginine active mTORC1 dans des cellules de mammifères (Hara et al., 1998). Mais l'étude de cette voie des acides aminés n'est décortiquée qu'en 2008 avec la découverte des RagGTPase (Sancak et al., 2008). Dans cette étude, l'équipe de Sabatini démontre une activité GTPase du complexe Rag suite à une stimulation par les acides aminés. Ils montrent notamment par une approche gain de fonction, qu'une forme de RagA liée au GTP la rendant constitutivement active empêche l'inhibition de mTORC1 lors de la privation en nutriments.

Les Rag sont des petites GTPases non conventionnelles qui fonctionnent en hétérodimère, RagA ou RagB sont liées à RagC ou RagD. Ces GTPases sont liées aux lysosomes par le complexe Ragulator composé de 5 protéines (LAMTOR 1 à 5) (Bar-Peled et al., 2012; Sancak et al., 2010; Su et al., 2017). Les Rag peuvent être présentes sous deux conformations, l'état "actif" où RagA/B est lié au GTP et RagC/D au GDP et un état "inactif"

où RagA/B est GDP et RagC/D-GTP (K. Shen et al., 2017). En 2018 et en 2019 un modèle cristallographique de l'interaction entre les RagGTPase-Ragulator-mTORC1 par l'équipe de Sabatini et R. Williams a montré une organisation dimérique de mTORC1 avec Raptor en intermédiaire de contact entre les Rag et mTOR. Raptor interagit avec les formes actives des Rags : RagA-GTP et RagC-GDP et permet suite à sa liaison de garder le complexe Rag sous forme active (Anandapadamanaban et al., 2019; Rogala et al., 2019) (**Figure 30**).

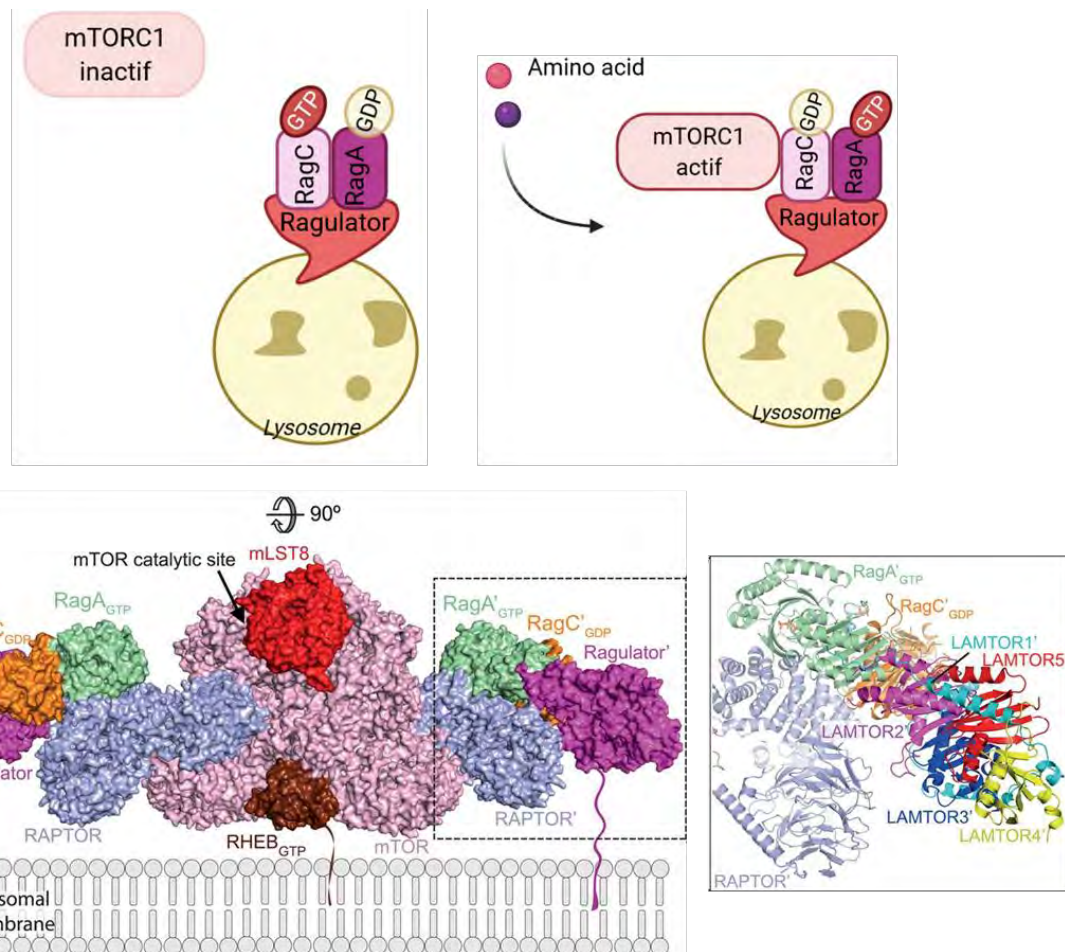


Figure 30 – Le complexe Ragulator-RagGTPase. Le complexe Ragulator est composé de cinq protéines LAMTOR 1 à 5. Ce complexe, lié à la membrane lysosomale, permet de recruter les Rag-GTPase, des petites GTPase à la conformation inhabituelle. Par exemple, lorsque RagA est sous forme GTP et RagC sous forme GDP, le complexe est actif. Si RagA est sous forme GDP et RagC sous forme GTP alors le complexe est inactif. Sous forme active les RagGTPase lient Raptor et permettent le recrutement et l'activation de mTORC1. Modèle cristallographique d'après Anandapadamanaban et al, 2019.

mTORC1 reconnaît la concentration des acides aminés dans le cytosol mais aussi dans le lysosome via des mécanismes différents. De 2012 à aujourd'hui de nombreux facteurs moléculaires responsables de la régulation positive ou négative de l'activité GTPase des Rag en réponse aux nutriments ont été identifiés tels que GATOR 1/2 (*GAP activity toward the*

Rags 1/2) ; FLCN-FNIP (*folliculin-folliculin interacting protein*) ; KICSTOR. En tout, 26 complexes sont supposés avoir un rôle dans la perception/détection de nutriments par mTORC1. Par exemple, dans le cytosol, GATOR 1 et GATOR 2 permettent de moduler la charge en GTP des Rag. Lorsque les concentrations en acides aminés cytosoliques est faible GATOR 1 hydrolyse le GTP de RagA/B et inhibe ainsi mTORC1 (K. Shen et al., 2018). GATOR 2, lui, antagonise GATOR 1 et agit comme un régulateur positif de mTORC1.

Récemment de nouveaux senseurs des acides aminés ont été découverts. Le premier est la Sestrin 2 qui lorsque le niveau de leucine est faible inhibe GATOR 2, freinant ainsi l'activité de mTORC1. En présence de leucine, Sestrin 2 se dissocie de GATOR 2 permettant de lever l'inhibition de mTORC1 (Saxton et al., 2016; Wolfson et al., 2016). Le deuxième est CASTOR 1 (*cellular arginine sensor for mTORC1*), il inhibe aussi GATOR 2 en absence d'arginine et se dissocie du complexe en présence d'arginine (Chantranupong et al., 2016; Saxton et al., 2016). Il existe aussi d'autres senseurs des acides aminés, comme LRS (*leucyl-tRNA synthetase*), une protéine impliquée dans le transport de la leucine. Un travail en 2012 lui accorde un rôle de GAP directement sur RagD pour l'activer (Han et al., 2012). Un autre décrit que LRS est capable d'activer le couple Vps34-PDL1 en amont de mTORC1. LRS active Vps34 qui augmente le PI3P permettant le recrutement de PDL1 sur le lysosome qui in fine active mTORC1 (Yoon et al., 2016). D'autres protéines comme SAMTOR (*S-adenosylmethionine sensor for mTORC1*) perçoivent et ancrent la S-adénosylméthionine la principale source de méthionine dans la cellule (Gu et al., 2017).

La protéine transmembranaire du lysosome SLC38A9 (*Sodium-coupled neutral amino acid transporter 9*), est capable de percevoir le flux des acides aminés dans le lumen lysosomal. SLC38A9 agit comme un transporteur d'acide aminé neutre en présence de l'arginine (S. Wang et al., 2015). Elle collabore avec Ragulator pour stimuler le chargement des RagA/B en GTP agissant comme une GEF-like via à vis de ce complexe.

D'autres mécanismes ont été identifiés couplant la perception de matériel cellulaire à l'activation de mTORC1. C'est le cas de la v-ATPase lysosomal, dont la première fonction est de maintenir le pH faible du lysosome, mais qui a aussi été décrite comme interagissant avec les Rag-Ragulator pour influencer la charge des RagGTPase (C.-S. Zhang et al., 2014). Le complexe folliculine FLCN-FNIP2 peut aussi agir comme une GAP pour RagC/RagD afin d'activer mTORC1 en présence de certains acides aminés (Fromm et al., 2020) (**Figure 31**). Enfin, il a été décrit très récemment la présence sur le lysosome d'une protéine transmembranaire nommée LYCHOS (*Lysosomal Cholesterol Signaling*) qui active mTORC1

suite à la liaison à sa partie N-terminal d'un cholestérol. LYCHOS séquestre GATOR1 permettant le recrutement des RagGTPases (H. R. Shin et al., 2022).

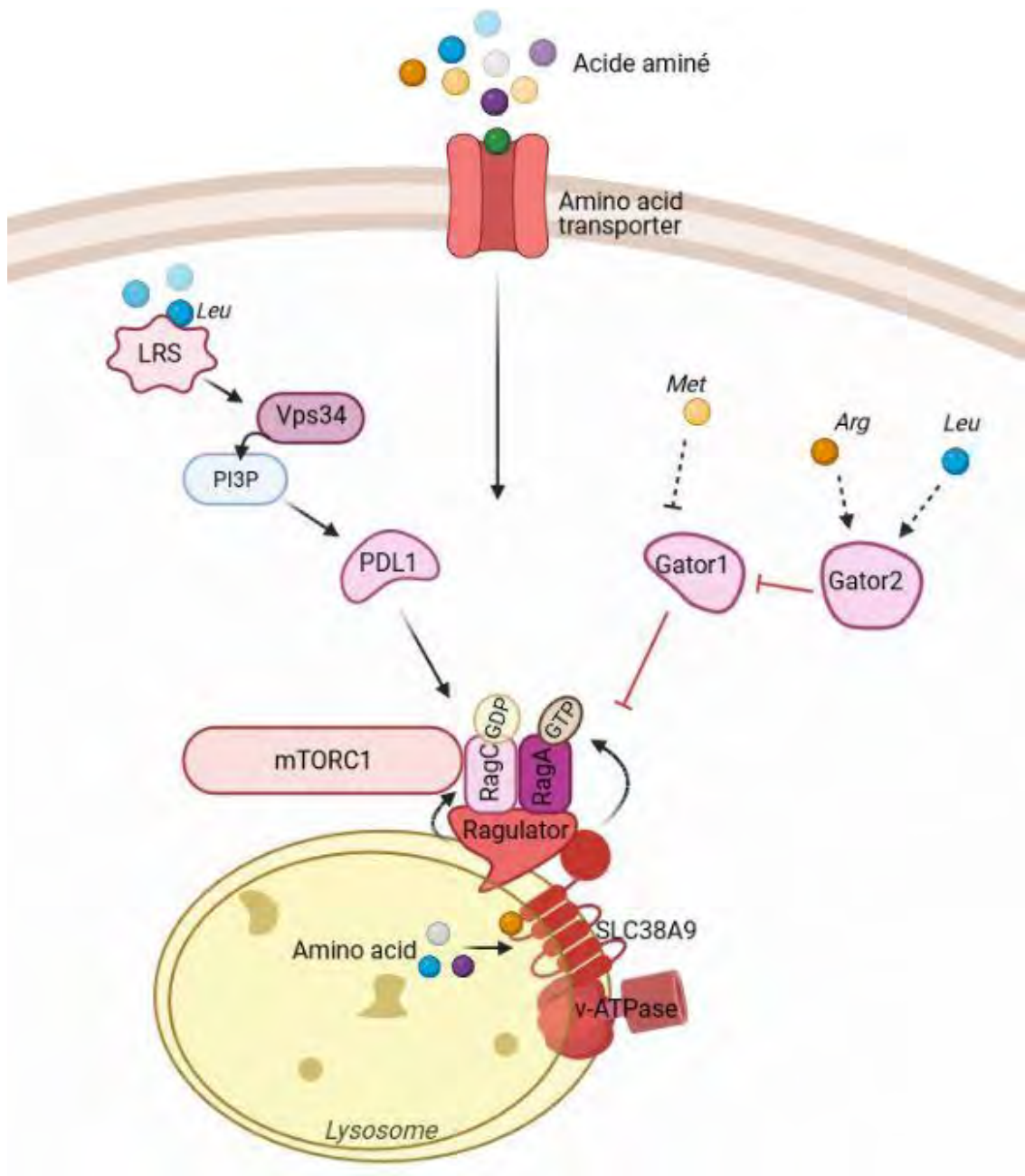


Figure 31 - Régulation de mTORC1 par les acides aminés

3.3.3 L'énergie, l'oxygène, le stress et la localisation.

L'énergie, l'oxygène et le stress cellulaire.

L'énergie cellulaire, représentée par l'ATP, a aussi un rôle dans le contrôle de la voie mTORC1. En cas de privation en glucose, la quantité d'ATP décroît ce qui alarme la protéine qui perçoit l'énergie cellulaire : l'AMPK (AMP-activated protein kinase). L'AMPK inhibe

directement mTORC1 en phosphorylant Raptor et aussi indirectement en activant TSC2 (Gwinn et al., 2008; Inoki et al., 2003).

mTORC1 permet aussi de stimuler la biogenèse et l'activité mitochondriale, permettant ainsi de renforcer la capacité de production d'ATP. De façon 4E-BP1-dépendante, mTORC1 contrôle la transcription d'ARNm codant pour des protéines mitochondriales incluant des composants du complexe V de la chaîne respiratoire ou encore TFAM (*transcription factor A mitochondriale*) un facteur de transcription permettant l'activation des deux promoteurs majeurs de l'ADN mitochondriale (Morita et al., 2013).

L'accumulation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS : *reactive oxygen species*) peut se produire après une augmentation trop importante de la production d'ATP ou suite à un dysfonctionnement des mitochondries (le stress oxydatif). Les ROS ont été décrits comme pouvant soit activer mTORC1, soit l'inhiber. Dans le premier cas, les ROS semblent pouvoir directement oxyder le complexe TSC menant à son inactivation et au final à l'activation de mTORC1 (Yoshida et al., 2011). Cependant les ROS semblent aussi activer TSC2 via la voie de l'AMPK et ainsi inhiber mTORC1 (Alexander et al., 2010). L'effet des ROS sur mTORC1 semble dépendre, au final, du contexte cellulaire, de la persistance et du niveau du stress oxydatif.

Une dysfonction du RE, une hypoxie ou encore un stress de réplication d'ADN peuvent aussi inhiber mTORC1 en augmentant l'activité de protéines capables d'activer TSC2, ou en activant directement TSC2 (Appenzeller-Herzog & Hall, 2012; Brugarolas et al., 2004; Kang et al., 2011; Sofer et al., 2005). Ces éléments permettent de diminuer l'activation de mTORC1 et donc la prolifération cellulaire afin de protéger l'intégrité du génome.

Focale adhésion - spatial association.

Récemment l'implication de la distribution cellulaire du lysosome dans la cellule et le lien avec l'activité de mTORC1 a fait l'objet d'un certain nombre d'études. En effet, en se positionnant près de la membrane plasmique, en périphérie de la cellule, les lysosomes s'associent avec des points d'adhésion focaux créant ainsi des "hubs de signalisation localisés". Cela permet une intégration plus directe des signaux de facteurs de croissance et d'acides aminés dans la cellule. Par exemple le travail de Rabanal-Ruiz et al propose une régulation spatiale de mTORC1 (Rabanal-Ruiz et al., 2021). En effet en forçant la localisation de mTOR dans les adhésions focales, les auteurs montrent que mTOR est actif sur ce site même en absence du lysosome en périphérie de la cellule. Les voies moléculaires mises en jeu sont cependant encore totalement inconnues, et les questions sur la composition de ce complexe

mTORC1, ainsi que les signaux moléculaires mise en place en amont pour l'activer, restent encore sans réponse. Les auteurs suggèrent un rôle différent de mTORC1 en tenant compte de certains travaux antérieurs sur la levure où mTORC1 forme deux pool différents : un sur les vacuoles (équivalent des lysosomes) ayant une fonction sur la synthèse protéique et un autre sur les endosomes qui régulent les processus d'autophagie (Hatakeyama et al., 2019). Rabanal-Ruiz et al, émettent l'hypothèse que à cette localisation mTORC1 recrute peut-être des protéines spécialisées dans l'adhésion ou la migration (Rabanal-Ruiz et al., 2021).

3.4 La régulation de mTORC1 par les phosphoinositides et Mtm1.

L'implication des PIs dans la régulation de mTORC1 est initialement mise en évidence par l'identification de la cascade PI3K/Akt/TSC (Manning et al., 2002; Tee et al., 2003). Suite à une stimulation à l'insuline des PI3K de classe de I sont activées et permettent la conversion du PI(4,5)P₂ membranaire en PIP₃ qui sert de ligand pour recruter Akt, via son domaine PH. Cette dernière est phosphorylée par PDK1 et mTORC2 et active le reste de la cascade.

3.4.1 Implication du PI3P.

Le PI3P est produit majoritairement par Vps34, des études montrent que cette enzyme est impliquée dans l'activation de mTORC1 notamment suite à une stimulation par des nutriments. Hirsch et al, en 2014 montrent que Vps34 produit du PI3P au niveau des lamellipodes ce qui stimule localement l'activité de mTORC1 (Hirsch et al., 2014) (**Figure 32A**). Ou encore Mohan et al, qui montrent que Vps34 stimulée à la membrane plasmique recrute PIKFyve. Le complexe Vps34 et PIKFyve séquestrent TSC1 empêchant ainsi la formation du complexe TSC : il n'y a donc plus l'inhibition de mTORC1 (Mohan et al., 2016) (**Figure 32B**).

Plus directement, suite à une stimulation avec des acides aminés Vps34 s'active et induit une augmentation du PI3P sur les endosomes tardifs/lysosomes qui va recruter PDL1 via son domaine PX. Cette protéine activée produit de l'acide phosphatidique (PA) sur les endosomes tardifs/lysosomes qui dissocie DEPTOR (une protéine inhibitrice de mTORC1), ce qui permet *in fine* une augmentation de l'activité de mTORC1 (Fang et al., 2001). Cette association PI3P-PDL1 a aussi été observée lorsque les acides aminés activent le transporteur LRS (*Leucyl tRNA synthetase*) dans le cytosol, ce dernier active le complexe Vps34 puis PDL1 en amont de mTORC1 (Yoon et al., 2016) (**Figure 32C**).

Enfin, il y a un lien entre le PI3P et la mobilité du lysosome. Le PI3P forme un complexe composé de FYCO1 (*FYVE and coiled-coil domain autophagy adaptator 1*) et de protrudine, deux protéines responsables de la mobilité des endosomes tardifs/lysosomes vers la membrane

plasmique (Hong et al., 2017). La Protrudine est capable de lier la kinésine 1 (proteine motrice sur les microtubules) et FYCO1 est une protéine adaptatrice qui fait le lien entre les endosomes tardifs/lysosomes et les microtubules. L'activation de Vps34, et donc la synthèse de PI3P permet l'engagement FYCO1 qui contribue au rapprochement des lysosomes et de la membrane plasmique favorisant ainsi l'activation de mTORC1 par les facteurs de croissance. Cette observation rejoint l'idée que le positionnement du lysosome conditionne la réponse de mTORC1 aux stimulations nutritionnelles (Korolchuk et al., 2011) (Figure 32D).

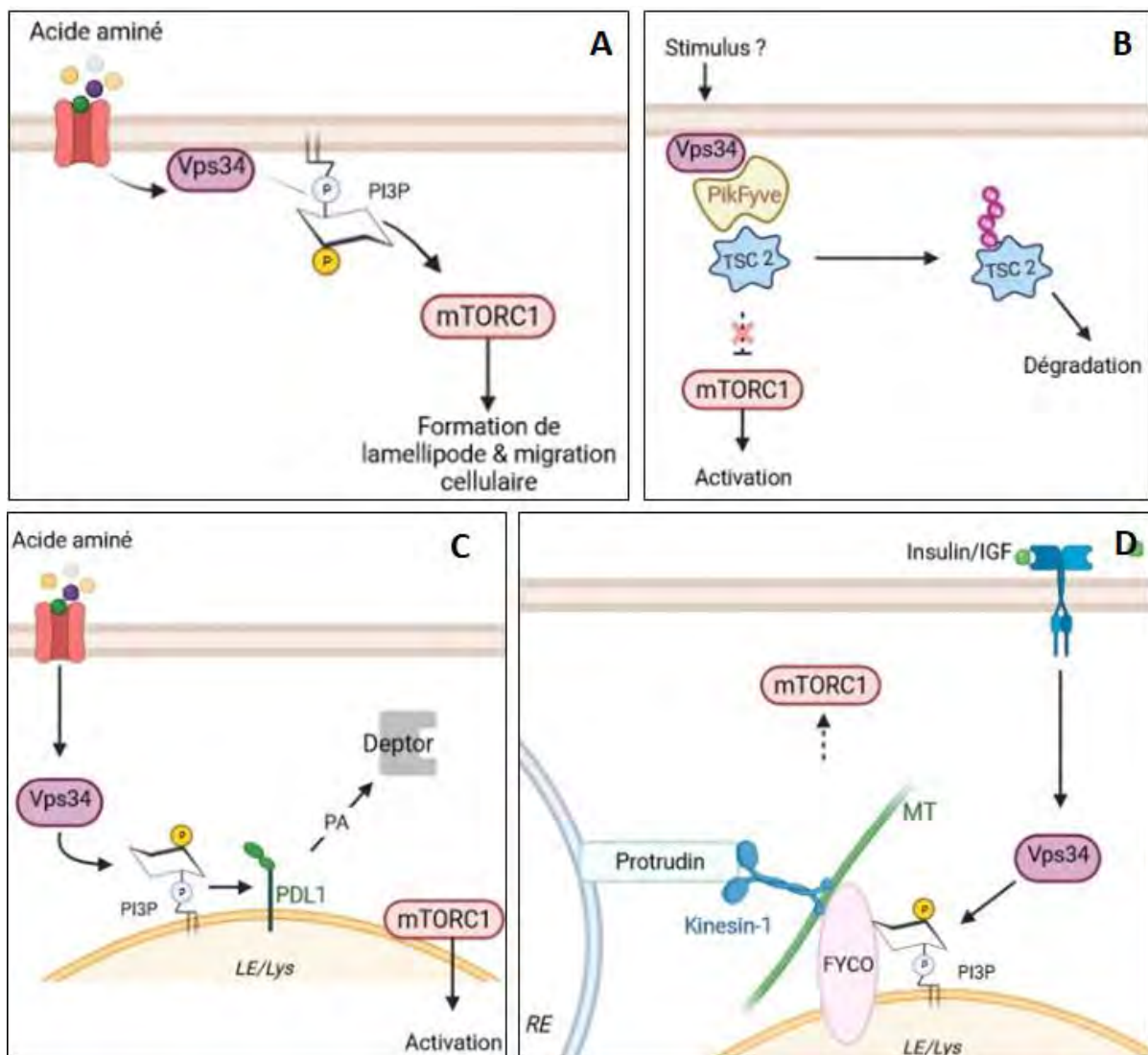


Figure 32 - Rôles du PI3P dans l'activation de mTORC1

3.4.2 Implication du PI(3,5)P₂

D'autres PIs sont aussi impliqués dans l'activation de mTORC1 de façon directe ou indirecte. C'est le cas du PI(3,5)P₂. Dans un travail publié en 2012, Bridges et al, montrent que

suite à une stimulation par les acides aminés ou l'insuline il y a une augmentation du PI3P et du PI(3,5)P₂ avec un enrichissement du PI3P à la membrane plasmique des cellules 3T3-L1 (*cette localisation est propre à ces cellules et n'a été observée dans aucun autre modèle*). Dans ces cellules l'addition de PI(3,5)P₂ perméant induit un recrutement de mTORC1 à la membrane plasmique permettant le déclenchement de l'assemblage de son complexe et son activation. Ni l'addition de PI3P ni l'addition de PI(3,5)P₂ n'affecte la phosphorylation de Akt. Cette activation est donc indépendante de cette voie. Il montre que la protéine Raptor a un domaine WD40 qui lie le PI(3,5)P₂, et que c'est son augmentation locale à la membrane qui recrute le complexe mTORC1 (Bridges et al., 2012).

Dans le même sens, une deuxième étude par la même équipe utilise le modèle de la levure *S. Cerevisiae* et montre que le PI(3,5)P₂ régule le positivement et l'activation de mTORC1 sur les vacuoles lysosomales. Le PI(3,5)P₂ lie l'homologue de Raptor et aussi celui de S6K pour l'amener proche de mTORC1 et favoriser sa phosphorylation (Jin et al., 2014). Ces deux études suggèrent donc que le PI(3,5)P₂ joue un rôle plutôt direct dans l'activation de mTORC1.

3.4.3 Implication d'autres PI

Contrairement à l'effet activateur du PI3P, au PI(3,5)P₂ et le PIP₃, il a été proposé que d'autres PIs exerceraient l'effet inverse. L'équipe de Haucke, publiée en 2017 et 2019 que le PI(3,4)P₂ contrôlerait négativement mTORC1 de façon indépendante de la voie Akt. Dans des HEK293 et des cellules HeLa privées de sérum, la PI3K de classe II, PI3KC2β, synthétise du PI(3,4)P₂ au niveau des endosomes tardifs / lysosomes. Ce PI recrute 14-3-3γ qui en se liant à Raptor va l'empêcher de s'associer au complexe mTORC1, un prérequis pour l'activité de mTORC1 (Marat et al., 2017). Une suite de ce travail montre que dans des conditions de disponibilité en facteurs de croissance, la PI3KC2β est inhibée dans le cytosol via une phosphorylation d'une kinase atypique : la protéine kinase N (*PKN*), gardant mTORC1 actif (Wallroth et al., 2019).

Enfin un autre travail a mis l'accent sur l'implication du PI(4,5)P₂ dans la régulation de mTORC1. La délétion des PIP4K source de PI(4,5)P₂, entraîne la diminution de l'activité basale de mTORC1 dans des conditions de privation et de façon TSC-indépendante (V. A. Gupta et al., 2013).

En conclusion, les deux substrats de MTM1, PI3P et le PI(3,5)P₂, semblent jouer un rôle majeur dans la régulation positive de mTORC1. La question suivante est donc : Est ce que mTORC1 est impliqué dans la pathologie XLCNM liée à la mutation de MTM1 ?

3.4.4 Implication de Mtm1 : rôle de mTORC1 dans l'XLCNM

En 2013 Fetalvero et al., ont publié un travail montrant une altération de l'autophagie dans des souris MTM1-KO obtenues par la stratégie de « gene trap » (*Mtm1*^{gt/y}). L'accumulation de LC3-I, LC3-II et p62, les marqueurs les plus connus de l'autophagie, montrent un blocage tardif de l'autophagie (Fetalvero et al., 2013). Ces observations sont appuyées par une autre étude parue la même année, dans l'autre modèle murin *Mtm1*-KO (Al-Qusairi et al., 2013).

L'autophagie est altérée dans de nombreuses myopathies (Levine & Kroemer, 2008) et certains membres de la famille des MTMs avaient déjà été impliqués dans ce processus : notamment MTMR3 (Taguchi-Atarashi et al., 2010) et MTMR14 (Dowling et al., 2010). De plus, ces résultats sont cohérents avec l'accumulation de protéines ubiquitinylées et l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles retrouvées dans l'XLCNM (Gavriilidis et al., 2018; Komatsu et al., 2007).

Fetalvero et al, proposent que les défauts de l'autophagie sont la conséquence d'une hyperactivation de mTORC1 (une hyperphosphorylation de S6K^{Thr389} de S6^{Ser240/244} et de 4EBP1^{Thr37/46} ainsi qu'une hyperphosphorylation inhibitrice d'ULK1^{Ser757}, facteur initiateur de la formation du phagosome). Ainsi ils procèdent à l'inhibition pharmacologique de mTOR par l'inhibiteur ATP-compétitif AZD8055 qui normalise les marqueurs d'autophagie. Le traitement AZD8055 sur des souris *Mtm1*-KO a même un effet positif sur la masse musculaire et diminue les accumulations anormales de filaments intermédiaires de desmine. De façon très intéressante, ils ne trouvent pas d'augmentation de la phosphorylation de Akt qui active mTORC1 (Fetalvero et al., 2013), suggérant que l'activation de mTOR est indépendante de la voie PI3K/Akt.

OBJECTIF DE THESE

Comme détaillé dans l'introduction, les PI sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires et leur importance est soulignée par le grand nombre de pathologies liées à la mutation d'enzymes de leur métabolisme. Le PI3P et le PI(3,5)P₂ sont deux substrats de MTM1, une PI3P-phosphatase dont les mutations (qui affecte son expression) sont à l'origine de la myopathie centronucléaire liée à l'X (XLCNM). Il en résulte une augmentation dans le muscle squelettique de ses substrats PI3P et PI(3,5)P₂, qui ne sont plus déphosphorylés. A ce jour, le rôle de l'augmentation de PI3P et PI(3,5)P₂ dans l'étiologie de la pathologie est encore grandement inconnu. Une étude (Fetalvero et al, 2013) a mis en cause le complexe protéique mTORC1 dont l'activation anormale serait un évènement moléculaire majeur dans l'XLCNM. Par ailleurs, plusieurs études ont décrit un rôle des deux substrats de MTM1 dans la régulation de mTORC1 (Bridges et al., 2012; Fang et al., 2001; Hirsch et al., 2014; Hong et al., 2017; Jin et al., 2014; Mohan et al., 2016; Yoon et al., 2016) suggérant que la dérégulation de mTORC1 puisse être directement liée à l'augmentation de PI3P et PI(3,5)P₂.

Les travaux de l'équipe s'inscrivent dans la recherche des causes de cette pathologie, et du rôle de MTM1 et plus particulièrement de ses substrats dans le développement des défauts musculaires observés dans cette pathologie.

Ainsi, K. Hnia a questionné le rôle des systèmes de dégradation dans les myopathies congénitales incluant la XLCNM. Ainsi, il a effectué un crible shRNA ciblant des gènes dont la mutation est impliquée dans d'autres myopathies (36 cibles) dans des cellules C2C12. Cette stratégie non biaisée avait pour but de mettre l'accent sur d'éventuelle spécificité de XLCNM par rapport à d'autres CNMs. De façon étonnante, ces premiers résultats ont montré que l'absence de MTM1 entraîne une augmentation de la synthèse protéique. Cette observation a été à l'origine du projet de recherche que j'ai effectué au cours de ma thèse.

K. Hnia a recherché quels pouvaient être les acteurs de l'augmentation de cette synthèse protéique. Il a donc procédé à un traitement des différents modèles de l'XLCNM avec un inhibiteur de mTORC1 (AZD8055) confirmant les effets bénéfiques de celui-ci comme décrit auparavant par Fetalvero et al. (Fetalvero et al, 2013). L'idée émergente serait que MTM1 joue sur la synthèse et la dégradation des protéines via mTORC1 pour assurer la différenciation et le maintien du muscle squelettique.

Les différents modèles utilisés, tant par K. Hnia que par moi-même au cours de ma thèse sont :

- Les souris *Mtm1*-KO déjà caractérisées précédemment (Buj-Bello et al, 2002), qui sont des souris au fond génétique 129/Sv ayant une mutation dans l'exon 4 (*Mtm1*-y δ 4).
- A partir de ces souris seront aussi dérivées les cellules primaires musculaires murine (cellules satellites isolées des membres postérieurs des souriceaux).
- D'autres modèles tels que des cellules de patients XLCNM (mutations entraînant une perte complète de la protéines MTM1), nous ont été fournies par la myobanque de l'association française de myopathie (AFM).
- Enfin, une lignée stable de myoblastes C2C12 mutée dans l'exon 8 de MTM1 par la technique de CRISPR/Cas9 (Mansat et al, en soumission – cf : annexe 2) : lignée C2C12 MTM1-KO^{cas9} avec une perte de l'expression de la protéine MTM1.

Partant de ces observations et des travaux de la littérature, l'objectif de ma thèse a été de déterminer les mécanismes moléculaires mis en jeu menant à la suractivation de mTORC1 dans les modèles XLCNM.

1) Par quelle voie mTORC1 est-il activé ?

Pour répondre à cette question, je me suis intéressée aux différentes protéines impliquées dans la régulation de mTORC1. Pour cela nous avons utilisé une stratégie innovante permettant de tagguer le lysosome (LysoTag) avec une étiquette 3xHA. Ceci nous permet d'isoler le lysosome entier par une immunoprécipitation et de l'étudier par protéomique. Nous avons mis à jour une accumulation importante de différentes protéines clés dans le recrutement de mTORC1 par les acides aminés aux lysosomes, dans un modèle MTM1-KO^{cas9} : les protéines du complexe RAGULATOR et les RagGTPases. Ces résultats ont été confirmés dans différents modèles avec de multiples techniques, montrant cette accumulation même en condition de « starvation » de la cellule.

2) Est-ce que MTM1 agit directement sur mTORC1 et par quel mécanisme ? Est-ce que l'activité enzymatique et donc les PI métabolisés par MTM1 interviennent dans cette régulation ?

Afin de répondre à cette deuxième question, nous avons dans un premier temps grâce à la réexpression d'une protéine phosphatase-inactive (AAV : MTM1-C375S) déterminer l'implication des phosphoinositides métabolisés par MTM1. Nous avons ensuite dressé un « portrait » de l'état des phosphoinositides dans les myotubes MTM1-KO, à l'aide des techniques de biologie cellulaire classique (immunofluorescence, western-blot, ...) mais aussi

grâce à une technique de lipidomique sur lysosomes isolés, nous avons étudié la localisation, la quantité et le métabolisme du PI3P et du PI(3,5)P₂, les substrats de MTM1. Pour finir nous avons mis en évidence une liaison entre le PI3P et le PI(3,5)P₂ et les composants du complexe RAGULATOR.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article ci-après que je signe en premier auteur et qui sera soumis très prochainement pour publication. Y sont décrits les mécanismes qui expliquent l'activation de mTORC1 sur le lysosome, dans un contexte où MTM1 est muté. Ces résultats apportent pour la première fois la preuve que la voie des acides aminés régulant l'activation de mTORC1 est dérégulée dans des cellules musculaires Mtm1-KO. Notamment, nous montrons que les PI substrats de MTM1 : PI3P, et PI(3,5)P₂ présents sur le lysosome peuvent servir de plateforme pour le complexe Ragulator et ainsi permettre une activation locale de mTORC1. Cette étude ouvre la perspective qu'un traitement pharmacologique par un inhibiteur de mTORC1 pourrait être un outil thérapeutique intéressant dans cette myopathie qui n'a pour le moment aucun traitement approuvé.

ARTICLE

Lysosomal phosphoinositides shapes RAGULATOR-RagGTPase activity and muscle growth

Melanie Picot¹, Melanie Mansat¹, Gaëtan Chicanne¹, Ping Li², Alexandre Stella³, Nesrine Hifdi¹, Isabel Singer⁴, Mariana E. G. de Araujo⁴, Shen Kuang⁵, Bernard Payrastra¹, Marie Vandromme¹, Odile Schiltz³, Ivan Nemazanyy⁶, Ganna Panasyuk⁷, Julien Viaud¹, Michael Laemmerhofer², Karim HNIA^{1*}

INSERM/UPS, UMR 1297, Metabolic and Cardiovascular Research Institute/I2MC, Toulouse, France.

Institute of Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical (Bio-)Analysis, University of Tuebingen, Germany.

IPBS, CNRS, UMR 5089, Proteomics and Mass Spectrometry of Biomolecules, Toulouse, France.

Division Cell Biology Biocenter Innsbruck, Center for Chemistry and Biomedicine, Innsbruck, Austria.

Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Chan Medical School, 373 Plantation St, Worcester, MA 01605, USA

Platform for Metabolic Analyses, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UAR 3633, Paris, France

INSERM U1151/CNRS UMR 8253, Université de Paris, Institut Necker-Enfants Malades (INEM), Paris, France.

*Corresponding author

Abstract

Lysosome (Lys) is a crossroad organelle of proteostasis ensuring organismal anabolic and catabolic balance. Among Lys assigned anabolic function, a special attention was given to the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1). The best-known mechanism of Lys-mTORC1 crosstalk relates to the translocation of mTORC1 to Lys surface in nutrient rich conditions to deploy anabolic programs. Lys-mTORC1 crosstalk has been expanding last decades into deciphering mTORC1 nutrient sensing pathways and involved molecular actors. However, how Lys membrane composition impacts Lys-mTORC1 crosstalk is still unclear. Using genetic screen supported by lysosome proteomic and lipidomic profiling, we identified a phosphoinositide-dependent mechanism that regulates Ragulator-RagGTPase recruitment and activity on lysosomal surface. This process relies on a conversion mechanism involving the phosphoinositide 3- phosphatase MTM1, a protein missed in congenital myopathy (XLCNM, X-linked centronuclear myopathy). We found MTM1 modulates physiological levels of Lysosomal PI3P and PI35P2, two phosphoinositides that bind and activate Ragulator/LAMTOR-RagGTPase axis. Our data identified a phosphoinositide signature of the lysosome membrane that control amino acid sensing pathway of mTORC1, with important implications in cell growth and for future therapy to combat muscle waste in centronuclear myopathy.

Introduction

Lysosomal (Lys) dysfunction was linked to muscle wasting (atrophy) during physiological aging (sarcopenia) and to many genetic related diseases such as Lys storage diseases (LSDs) and myopathies¹. How Lys function is controlled during muscle differentiation and maintenance is not known. Lysosome anabolic function relies on Lys-mTORC1 crosstalk which results in mTORC1 recruitment and activation on the lysosome surface². Conversely, lack of nutrients inhibits mTORC1 signaling, enhances Lys biogenesis and activates catabolic cascades such as autophagy³. mTORC1 activation **requires two steps controlled by distinct “AND gate” small GTPases**³. The Rag GTPases recruit mTORC1 to the lysosomal surface and stimulate its kinase activity in the presence of amino acids^{2,4}, where, if growth factors are present, the Rheb GTPase turns on its kinase activity⁵⁻⁷. The Rheb GTPase is activated by the canonical PI3K/AKT/TSC1-TSC2 axis, while several multi-protein complexes were found to regulate the RagGTPases³. This includes the heteropentameric Ragulator complex (LAMTOR1-5)², and the GATOR1⁸⁻¹⁰ and FLCN-FNIP2 complexes¹¹⁻¹³. When activated Rag heterodimer is capable of interacting with mTORC1 where RagA/B is bound to guanosine triphosphate (GTP) and RagC/D to guanosine diphosphate (GDP) (GTP-RagA-RagC-GDP). In contrast, the opposite nucleotide configuration (GDP-RagA-RagC-GTP) weakens the interaction with mTORC1 so that it does not localize to lysosomes and the pathway is suppressed^{4,14}. The RagGTPase heterodimer does not contain any lipidation motif, and its lysosomal localization is dictated by the Ragulator complex^{2,8}. Despite these structural and biochemical evidences, it is still unknown how lysosomal membrane composition impacts Ragulator-RagGTPases assembly and function. This is particularly important in physiological context such as cell differentiation where cell fate programs inflict profound changes in organelle homeostasis to adapt metabolic demand.

Results

Protein synthesis is affected in X-linked congenital myopathy and was restored by mTORC1 inhibition

Altered catabolic signals are frequently associated to physiological muscle waste during aging and many genetic muscle diseases such as myopathies^{15,16}. However, little is known about the status of anabolic signals such as translation, in these pathological contexts. We used the well-established muscle cell line C2C12 to screen (siRNA) the impact 36 congenital myopathy genes on protein synthesis in differentiated stages (Myotubes) (Fig1a and Extended Data Fig. 1a). To measure protein synthesis, we used Surface sensing of translation (SUnSET) and amino acid analogs of methionine: Alexa labeled 488-HPG or/and Alexa 595-AHA (L-homopropargylglycine and L-Azidohomoalanine, respectively) (Fig1a and Extended Data Fig. 1b). We found that inhibition of five genes (*CryaB*, *Dnm2*, *Sepn1*, *Vcp* and *Vma21*) impacted negatively the protein synthesis rate, while silencing four genes (*Mtm1*, *Bag3*, *Kihl40* and *Tia1*) promoted a reverse effect (Fig. 1b and Extended Data Fig. 1b). An important effect was noted when *Mtm1* was silenced (Fig. 1b and Extended Data Fig. 1b). *MTM1* is mutated in a severe congenital myopathy with neonatal onset (XLCNM) and encodes the phosphoinositide (PI) 3-phosphatase myotubularin (MTM1) (Fig.1b)¹⁷. We confirmed the observed effect on XLCNM patient primary myotubes as well as *in vivo* on *Mtm1*-KO mice model using SUnSET assay on muscle sections (Fig. 1c,d and Extended Data Fig. 1c). Examination of protein synthesis during cell differentiation in *Mtm1*-KO cells indicate that only middle stages myotubes (5-6 days) were affected and this persisted to late stages myotubes (9 days) (Fig. 1c,d and Extended Data Fig. 1c). CTRL cells showed several translational waves with peaks in proliferative cells (myoblast), in 5-6 and 7-8 days of myotube differentiation (Fig. 1e and Extended Data Fig. 1d). Importantly, we found that the high protein synthesis rate observed in XLCNM models was accompanied by altered cell differentiation manifested by less nuclei per myotube (Fig. 1c,e).

Fig.1

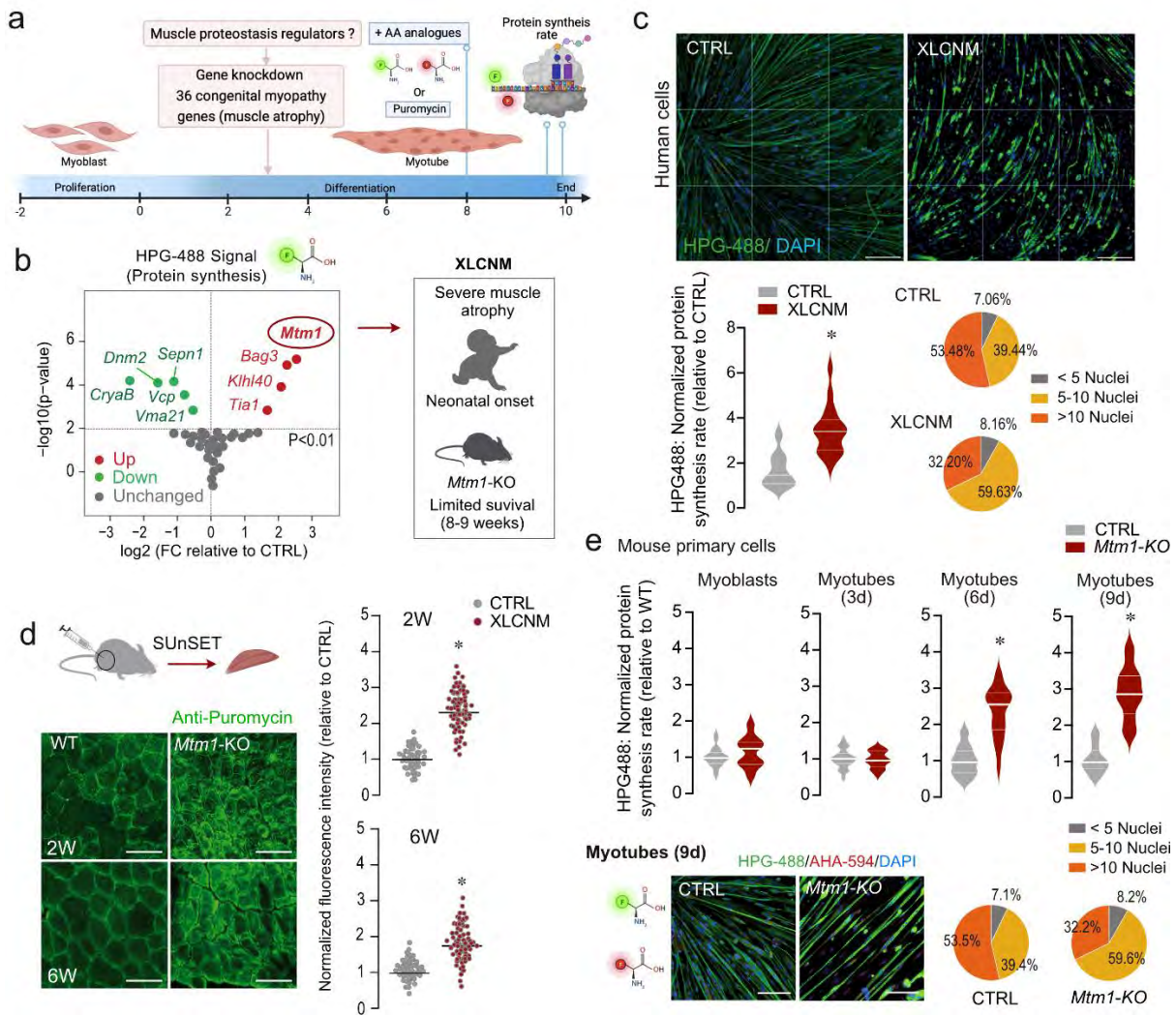


Fig. 1 | Protein synthesis deregulation in congenital myopathies. a. Experimental design to identify protein synthesis modifiers (within 36 genes mutated in congenital myopathies) during muscle cell differentiation. b. Volcano plot of protein synthesis rate (accessed by HPG-488 signal) expressed in log₂ (FC: fold change relative to CTRL siRNA) showed genes that affect positively (red plots) or negatively (green plots) protein synthesis rate in C2C12 myotubes. The knockdown of *Mtm1* (mutated in X-linked centronuclear myopathy, XLCNM), leads to higher protein synthesis rate. c. XLCNM patient myotubes showed elevated protein synthesis rate accompanied by defective differentiation capacity (percentage of multinucleated myotube). Data are \pm s.e.m.; n = 20-50 myotubes were analyzed from 3 independent experiments. * $P < 0.05$. Scale bar, 500 μ m. d. Puromycin-based measurement of protein synthesis *in vivo* from *Mtm1*-KO muscles (2- and 6-weeks old mice) using SURface SEnsing of Translation (SUnSET) assay. Images are representative of 3 to 4 mice. Data are \pm s.e.m.; n = 20-50 muscle fibers per mice were analyzed. * $P < 0.05$. Scale bar, 200 μ m. e. Time course analysis of *Mtm1*-KO mouse primary muscle cells during differentiation. Data are \pm s.e.m.; n = 20-50 myotubes were analyzed from 3 independent experiments. * $P < 0.05$. Scale bar, 200 μ m. Representative images of *Mtm1*-KO mouse primary myotubes showing HPG-488 signal and differentiation capacity (percentage of multinucleated myotubes). n = 20-50 myotubes from 3 independent experiments.

To identify the molecular cascades involved in the translational abnormalities in Mtm1-KO cells, we treated 5-days myotubes with drugs that inhibit protein synthesis (Fig. 2a). Except the PI3K inhibitors Wortmanin and LY294002 which showed deleterious effects on myotubes differentiation, all the drugs used decreased protein synthesis rate without obvious side effects (Fig. 2b-e and Extended Data Fig. 2a-c). Interestingly, the mTORC1 ATP-competitive inhibitors (Torin and AZD8055) have remarkable benefits on Mtm1-KO myotube differentiation (Fig. 2b-e). Then we examined mTORC1 pathways in XLCNM models (mouse and human primary myotubes and Mtm1-KO mice) (Fig. 2f and Extended Data Fig. 2d,e). We found that downstream mTORC1 phospho-targets: p-S6K (Thr389), pS6 (Ser235/236) and p-4EBP1(Thr3746) were increased (Fig. 2f and Extended Data Fig. 2d), while the growth factor sensitive phosphorylation of AKT (S473) and TSC1(Thr1462) were not affected (Extended Data Fig. 2d). Consistently, we did not observe any variation of blood glucose, insulin and IGF1 levels in Mtm1-KO mice in Fed or fasted conditions (Extended Data Fig. 2f). This data suggests that mTORC1 is overactivated in XLCNM models independently of growth factor or glucose sensitive pathways.

To address the physiological relevance of mTORC1 overactivation, we treated 2 weeks-old Mtm1-KO mice for 20 days with the mTORC1 inhibitor AZD8055 (AZ). Interestingly, the treatment extends mice lifespan and improved body and TA muscle weight and function (specific muscle force) of Mtm1-KO mice without impacting food intake (Fig. 2g,h and Extended Data Fig. 2g). Examination of mTORC1 downstream target (p-S6K and p-4EBP1) in treated muscles (tibialis anterior, TA) confirmed the efficacy of mTORC1 inhibition (Fig. 2i). Analysis of fibers morphology and ultrastructure indicates a remarkably improved TA muscle fibers size, oxidative capacity (SDH staining) and global myofiber organization (Z-line alignments) (Fig. 2j,k). As mTORC1 inhibition enhance autophagy, we analyzed LC3I/II and p62 levels by immunoblotting. We noted an increase of these autophagic markers in Mtm1-KO muscles suggesting a defect in late stages of autophagic process (Extended Data Fig. 2h). This defect seems unrelated to mTORC1 deregulation as AZ treatment did not restore LC3I/II and p62 levels in Mtm1-KO muscles (Extended Data Fig. 2h). Finally, examination of AZ effects in wild type mice did not show any impacts on mice survival, body and muscle weights (Extended Data Fig. 3a,b) as well as muscle force and organization (Extended Data Fig. 3c-e). However, consistent with a positive effect of mTORC1 inhibition on autophagy, we noted the presence of autophagosome/lysosomal structures in AZD8055 treated wild type muscles (Extended Data Fig. 3d). Collectively, these data indicate that inhibition of mTORC1 in Mtm1-KO mice model restored mTORC1-dependent translation with benefit on muscle growth and maintenance.

Fig.2

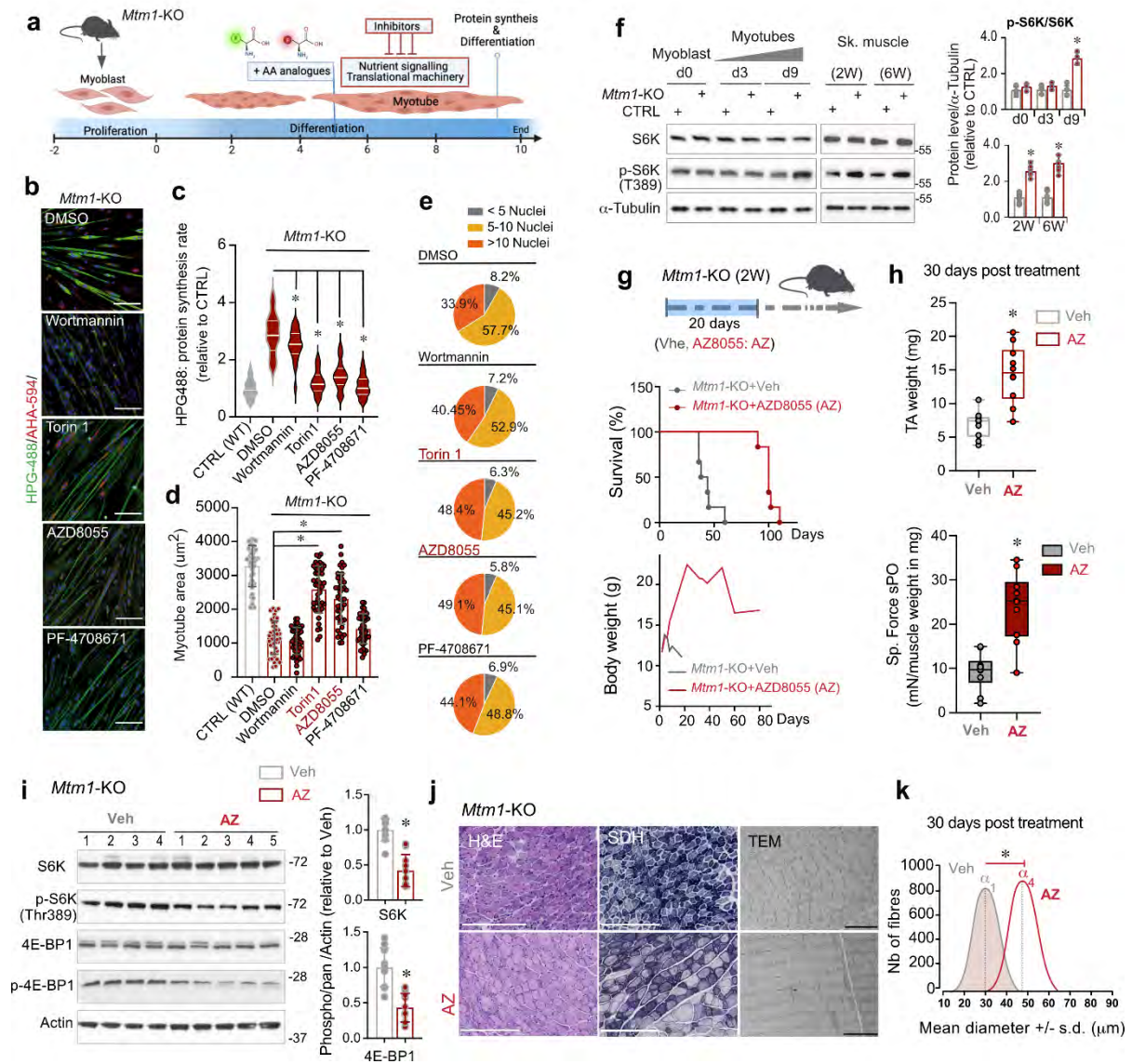
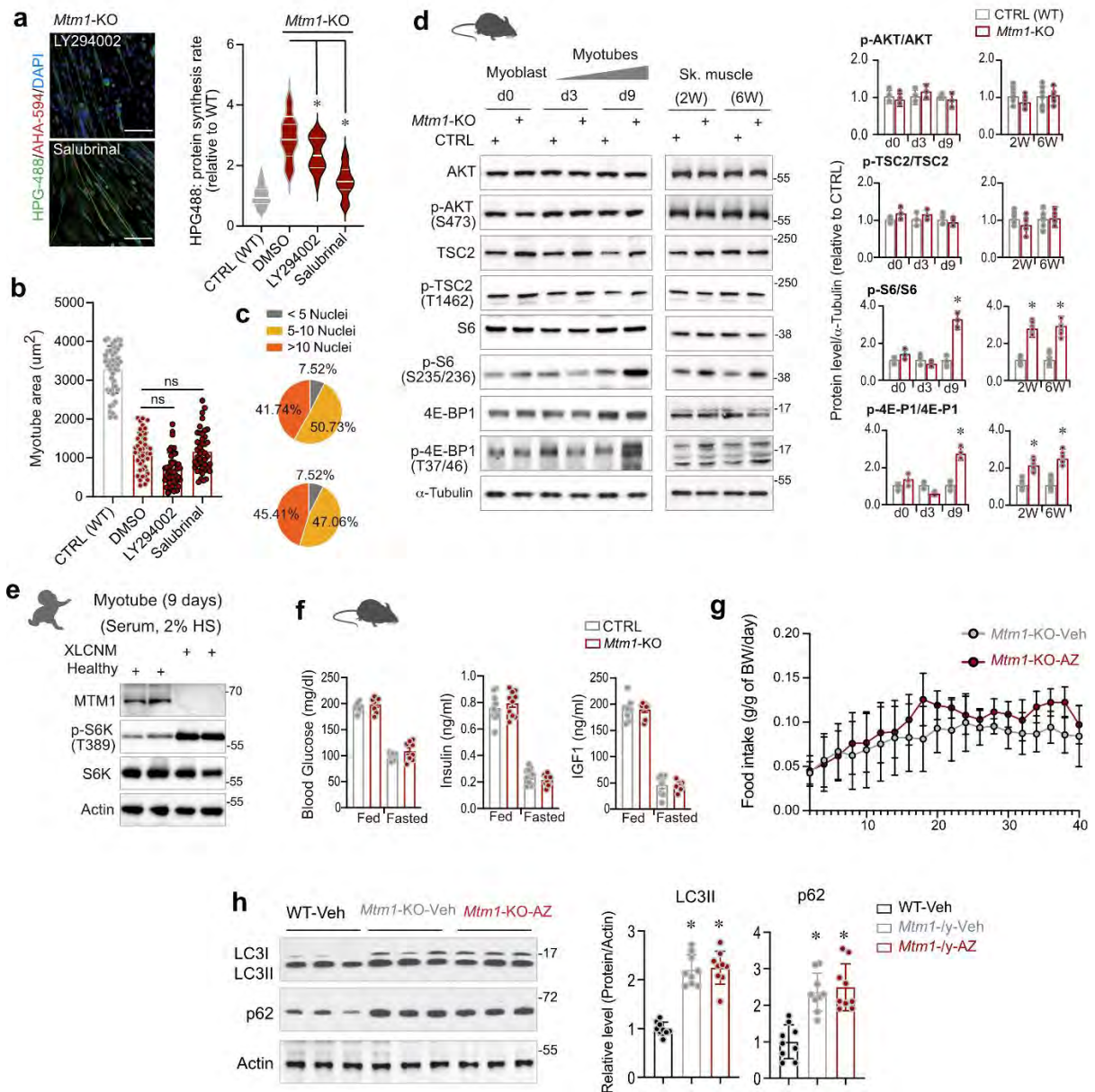


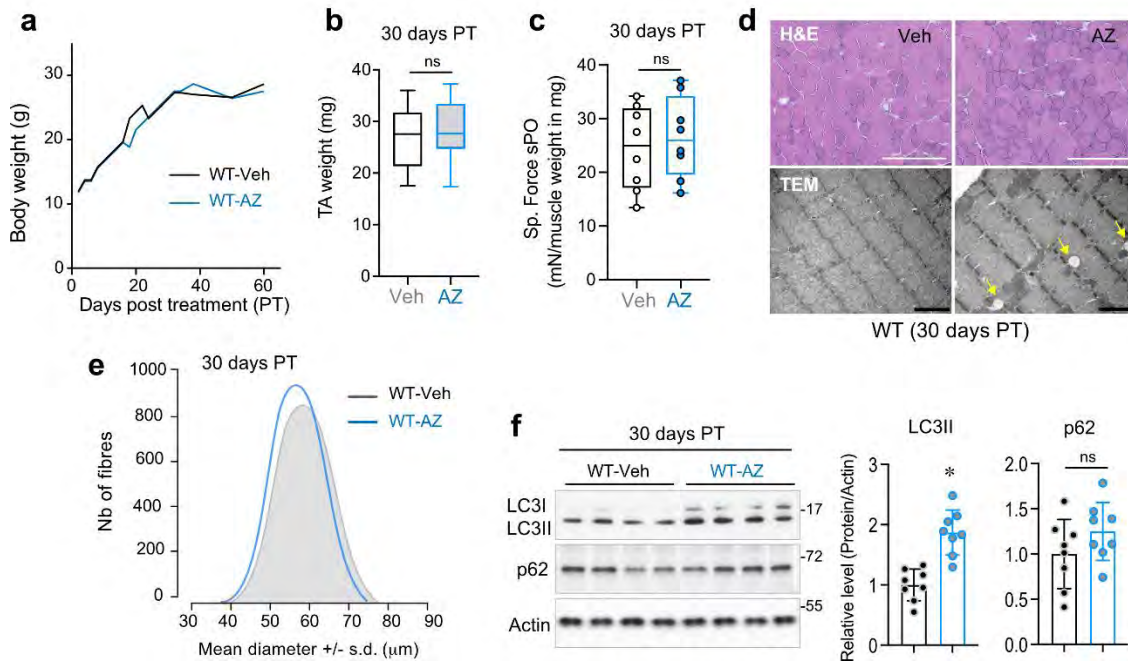
Fig.2 | Protein synthesis deregulation in XLCNM models is corrected by mTORC1 inhibition. **a.** Experimental design of drug-mediated inhibition of protein synthesis in *Mtm1*-KO myotubes. **b,c.** Representative image (HPG488 and AHA594 signals) of 9 days myotubes following drug treatment. Scale bar, 200µm. **d,e.** Effect of drug treatment on myotube area and percentage of multinucleated myotube, respectively. Data are \pm s.d.; $n = 20$ -30 myotubes were analyzed from 3 independent experiments. * $P < 0.05$. **f.** mTORC1 phospho-target S6K protein level in *Mtm1*-KO primary cells and muscles. For myotube data are \pm s.d. from 3 independent experiments, * $P < 0.05$. For muscles, data are \pm s.e.m. $n = 7$ -8 mice per group. * $P < 0.05$. **g.** Impact of mTORC1 inhibition (AZD8055/AZ treatment) on *Mtm1*-KO mice survival and body weight. data are obtained from. $n = 6$ -8 mice for each group (Veh: vehicles injected group with DMSO). **h.** Impact of 20 days AZ treatment on *Mtm1*-KO muscles (TA: Tibialis anterior) weight and specific force. Data are \pm s.e.m. $n = 7$ -8 mice per group. * $P < 0.05$. **i.** Representative immunoblots of mTORC1 phospho-target (S6K and 4E-BP1) levels in *Mtm1*-KO skeletal muscle homogenates following AZ treatment. Data are \pm s.e.m. $n = 7$ -8 mice per group. * $P < 0.05$. **j.** representative images showing the impact of AZ on *Mtm1*-KO muscle morphology (H&E: Hematoxylin and eosin and SDH: succinate dehydrogenase) and ultrastructure (TEM: Transmission Electron Microscopy). White scale bars, 500 µm and black scale bars, 2 µm. **k.** Muscle fiber diameter distribution following 30 days AZ treatment. Data are \pm s.d. a total of $n = 4$ mice per group were analyzed, * $P < 0.05$.

Extended data Fig.2



Extended data Fig. 2 | Increase of mTORC1 signaling in XLCNM models and the impact of mTORC1 inhibition. a-c. Impact of LY294002 (pan inhibitor of PI3Ks) and Salubrinal (selective inhibitor of eIF2 α , dephosphorylation) on protein synthesis (HPG488 signal), and differentiation capacity (myotube area and percentage of multinucleated myotubes) in *Mtm1*-KO cells. Data are \pm s.d.; $n = 20$ -30 myotubes were analyzed from 3 independent experiments ($*P < 0.05$). Scale bar, 200 μm . d. Immunoblots of downstream (p-AKT/AKT and pTSC2/TSC2) and upstream (S6/pS6 and 4E-BP1/p-4E-BP1) actors of mTORC1 signaling during cell differentiation and in skeletal muscles. For cell analysis, data are \pm s.d. from 3 independent experiments ($*P < 0.05$) and for muscle samples data are \pm s.d. $n = 6$ mice per group ($*P < 0.05$). e. Representative immunoblots from two independent experiments of mTORC1 phosphotarget (p-S6K) in CTRL and XLCNM primary myotubes. f. Glucose, Insulin and IGF1 serum levels of 3-4 weeks old *Mtm1*-KO mice in fed and fasted conditions. Data are \pm s.e.m. $n = 8$ -10 mice per group. g. Food intake of CTRL (Veh) vs. *Mtm1*-KO mice during AZ treatment. Data are \pm s.e.m. $n = 8$ -10 mice per group. h. Impact of AZ treatment on autophagy in *Mtm1*-KO muscle. Representative immunoblots of the autophagy markers LC3 and the adaptor p62 in skeletal muscle homogenates. Data are \pm s.e.m. $n = 8$ -10 mice per group ($*P < 0.05$).

Extended data Fig.3



Extended data Fig.3 | Impacts of mTORC1 inhibition on CTRL (wild type) mice. a. Time course analysis of wild type mice body weight following mTORC1 inhibition (AZ). Data are expressed as mean body weight of 8-10 mice. b-c. Impact of AZ treatment muscle (TA) weight and specific force in wild type mice. Data are \pm s.e.m. $n = 8-10$ mice per group (* $P < 0.05$). d. Impact of AZ on wild type muscle morphology (H&E: Hematoxylin and eosin) and ultrastructure (TEM: transmission Electron microscopy). Yellow arrow indicates autophagic vacuoles. Representative images from 3 analyzed mice per group. White scale bars, 500 μm and black scale bars, 2 μm . e. Muscle fiber diameter distribution following 30 days AZ treatment. Data are \pm s.d. a total of $n = 4$ mice per group were analyzed. f. Representative immunoblots of the autophagy markers LC3 and the adaptor p62 in skeletal muscle homogenates. Data are \pm s.e.m. $n = 8$ mice per group (* $P < 0.05$).

MTM1 represses the amino acid sensitive axis (RAGULATOR-RagGTPase) of mTORC1

To address how MTM1 impacts mTORC1 pathways, we examined mTOR cellular distribution in MTM1 deficient cells (XLCNM and Mtm1-KO myotubes) cultured in nutrient controlled medium. In differentiation medium (2% horse serum), XLCNM myotubes showed higher recruitment of mTOR on the Lys compared to CTRL human cells (Extended Data Fig. 4a). Nutrient depletion (HBSS) partially decreased mTOR lysosomal localization, while CTRL cells lost entirely mTOR co-localization with CD63 (a marker of late endosome/Lys membranes) (Fig. 3a). Furthermore, the addition of amino acids on MTM1 depleted cells did not enhance lysosomal mTOR recruitment, while IGF1 addition slightly increased mTOR/CD63 positive lysosomes (Fig. 3a). This is consistent with our previous analysis of PI3K/AKT/TSC1/2 axis in XLCNM models showing that MTM1 depletion did not affect the functioning of growth factor sensitive pathway of mTORC1 (Extended Data Fig. 2d). However, these observations support that the amino acid sensitive axis seems affected in XLCNM cell models. To investigate this, we used Lysosome immunoprecipitations using TMEM192-3XHA LysoTag expressing cells¹⁸, a well catheterized strategy to investigate mTORC1-lysosomal crosstalk. First, to overcome limitation related to primary cells, we generated Mtm1-KO C2C12 muscle cells by gene editing (CRISPR/Cas9, MTM1-KO^{Cas9}) (Extended Data Fig. 4b). These cells showed complete depletion of MTM1 expression compared to ShRNA-mediated gene knockdown, which maintain very few level of MTM1 (Extended Data Fig. 4b). Consistently, Mtm1-KO^{Cas} myotubes showed increased protein synthesis, mTORC1 signaling (Extended Data Fig. 4b) and defective differentiation manifested by decreased myotube size, and fusion index (number of nuclei within Myosin Heavy chain/MHC-positive myotubes) (Extended Data Fig. 4c). Then we generated stable CTRL and MTM1-KO^{Cas9} cells expressing the LysoTag TMEM192-3XHA. Analysis of these lines showed perfect co-localization of LysoTag (3XHA epitope) and CD63 (Extended Data Fig. 5a). Lyso-IP analysis from 8-9 days CTRL myotubes were free of other organelle markers (Golgi, peroxisome, Mitochondria and nuclei) and cytosolic proteins (Extended Data Fig. 5b). Only few Calnexin/CANX (the ER/SR proteins) were detected conceivably because of the close interaction of ER/SR network and the lysosome (Extended Data Fig. 5b). Also, we did not observe any morphological (Lys cellular distribution, number and size) or functional (Cathepsin activity on whole cell or LysoIP intact lysosomes) abnormalities due to LysoTag expression myotubes (Extended Data Fig. 5c,d). Consistent with previous observations on XLCNM primary cell models, the LysoTag MTM1-KO^{Cas9} myotubes showed an enrichment of mTOR on the lysosome in 2% HS medium as well as in nutrient depleted medium (HBSS) (Extended Data Fig. 5e,f). As for XLCNM myotubes, the addition of amino acids did not enhance lysosomal mTOR recruitment, while IGF1 increased mTOR/LysoTag (HA) positive lysosomes (Extended Data Fig. 5f). To investigate the amino acid sensitive axis, we examined Lyso-IP from myotubes and detected a significant enrichment of key components of the RagGTPase complex (RagA and Raptor) in MTM1-KO^{Cas9} cells (Fig. 3b). Consistently, the RagA lysosomal localization was enhanced in LysoTag MTM1-KO^{Cas9} (Fig. 3c) and GTP-trap assay from myotube lysates showed enrichment of active RagA-GTP/RagC-GDP complex in MTM1-KO^{Cas9} cells (Fig. 3d). Furthermore, the knockdown of RagA (ShRNA) or ectopic expression of dominant negative RagA-GTPase mutants (RagA-T21N) in MTM1-KO^{Cas9} cells decreases mTORC1 signaling and restore muscle cell differentiation (Fig. 3e,f). In contrast the expression of RagA-WT or the constrictively

active mutant (RagA-Q66L) worsen the phenotype (Fig. 3e,f). As the Rag-GTPase complex is activated by external or lysosomal amino acids as well as other metabolites, we inhibited two major pathways known to activate RagGTPase-mTORC1 axis: the Leu-transporter, Leucyl-tRNA synthetase (LRS)-dependent pathway, and the lysosomal Arg channel SLC38A9¹⁹⁻²¹ (Extended Data Fig. 6a,b). Pharmacological inhibition of LRS (compound BC-LI-0186) (Extended Data Fig. 6a) or genetic inhibition (ShRNA) of SLC38A9 (Extended Data Fig. 6b) did not show any benefits on MTM1-KO^{Cas9} myotube phenotype supporting that amino acid uptake or recycling is not impacted in our model. Furthermore, we explored whole cell (Extended Data Fig. 7a,b) and lysosome metabolites (Extended Data Fig. 7c,d) and did not see any difference between CTRL and LysoTag MTM1-KO^{Cas9} samples in term of known metabolites that activates mTORC1. These data support a nutrient-independent activation of RagGTPase axis in XLCNM models.

To identify potential molecular connection between MTM1 and the lysosomal RagGTPase-mTORC1 complex, we used semi-comparative proteomic approach of purified lysosome (LysolP) from CTRL and LysoTag MTM1-KO^{Cas9}. Consistent with immunodetection data, we identify significant enrichment of RagGTPase complex (RagA, RagC, Raptor) (Fig. 3g). Importantly, the pentameric RAGULATOR/LAMTOR complex, which anchors the RagGTPase to the lysosome membrane, was also highly enriched in MTM1-KO^{Cas9} cells in low serum (2%HS) and HBSS conditions (Fig. 3g,h and Extended Data Fig. 8a). Particularly, we detected a great enrichment of LAMTOR complex particularly and LAMTOR1 (LT1) and LAMTOR3 (LT3) (Fig. 3g,h and Extended Data Fig. 8a), two components of LAMTOR complex that interact physically and were involved in the assembly of LAMTOR-RagGTPase on the Lys surface. Importantly, the knockdown (ShRNAs) of LAMTOR1 impacted negatively mTORC1 signaling and improved MTM1-KO^{Cas9} cell differentiation (Extended Data Fig. 8b). Taken together these data indicate that MTM1 modulate the recruitment and the activity of RagGTPase complex possibly through LAMTOR complex.

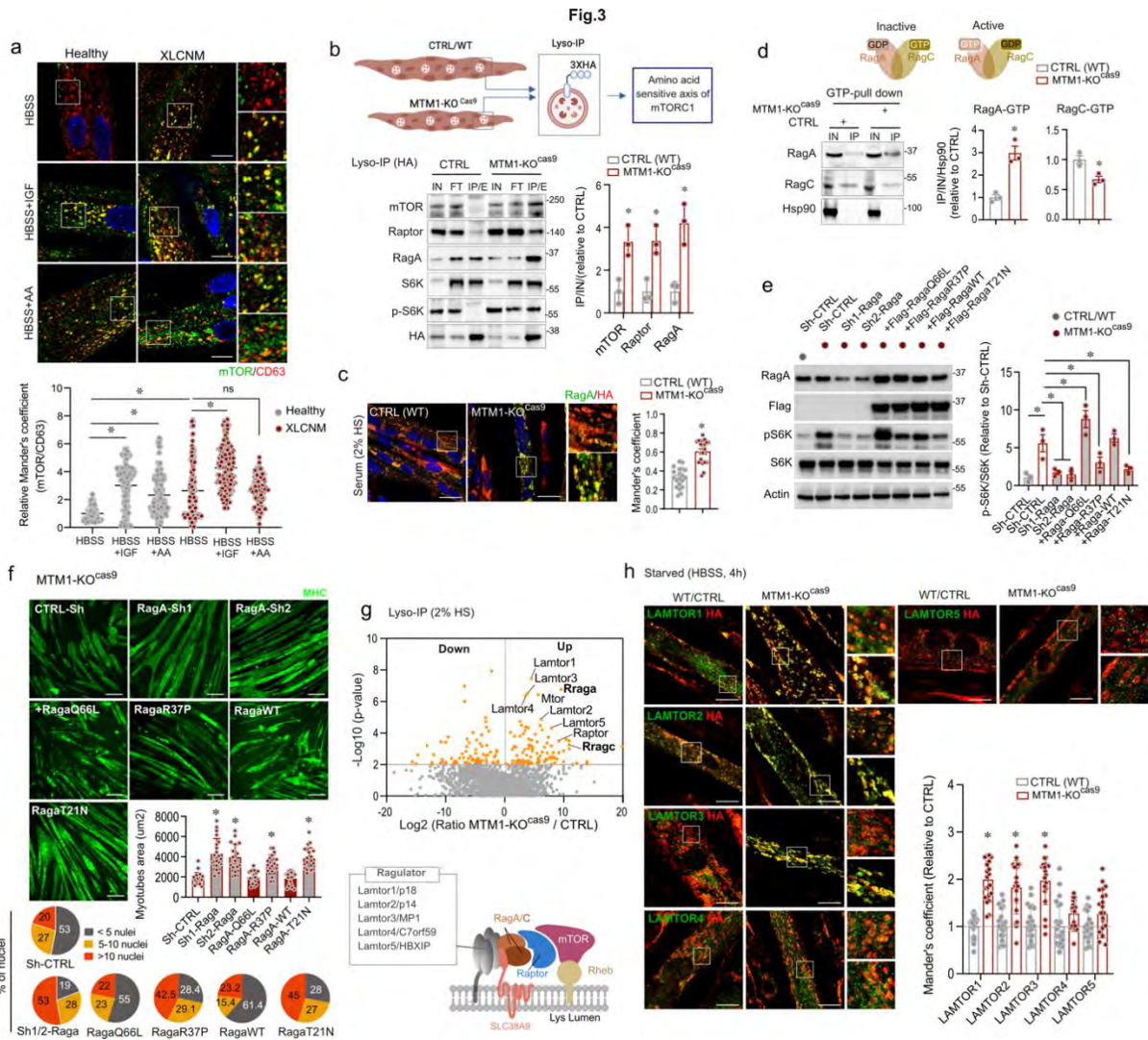
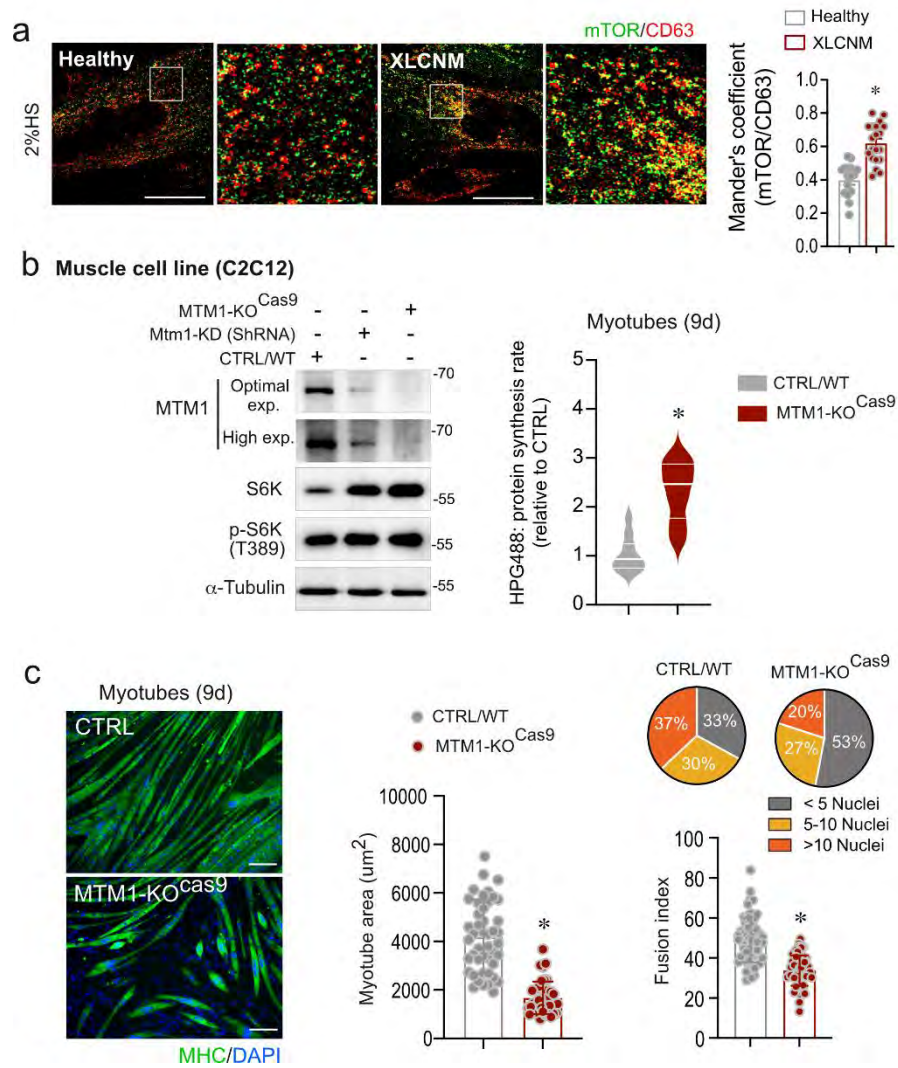


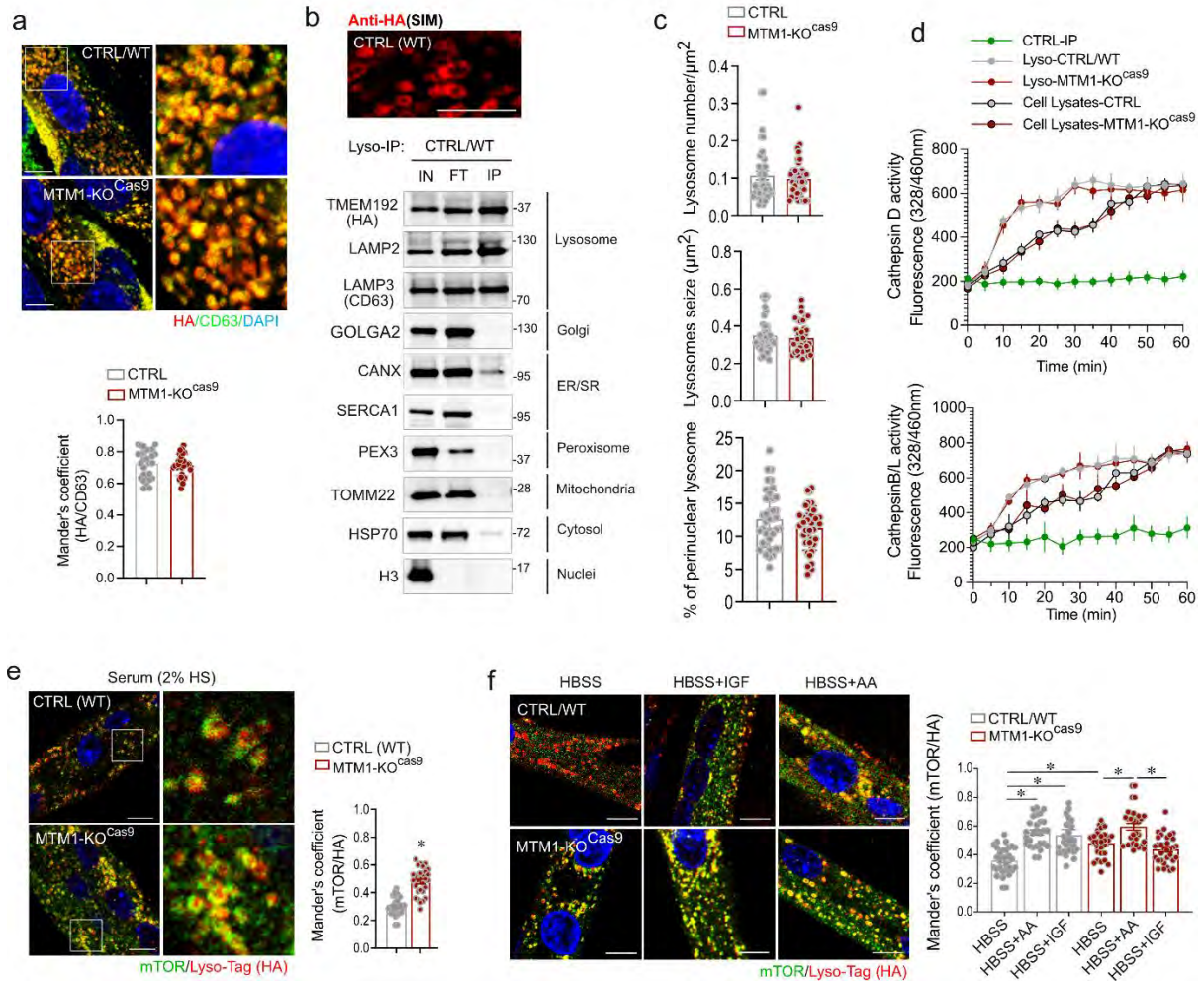
Fig.3 | MTM1 represses the amino acid sensitive axis (RAGULATOR/LAMTOR-RagGTPase) of mTORC1. a. Representative confocal images of CTRL and patient (XLCNM) myotubes labelled with mTOR and the Lyso marker CD63 in nutrient depleted (HBSS) and in presence of IGF or amino acids. Data are \pm s.d. for a total of $n = 50-100$ myotube per condition from 3 independent experiments. ($*P < 0.05$). Scale bar, 20 μ m. b. Lyso-IP strategy (3XHA-tagged lysosomes, LysoTag) and representative immunoblots of proteins involved in amino acid sensitive axis of mTORC1 (Raptor and RagA) and the downstream phosphotarget p-S6K. Data are \pm s.d. from 3 independent experiments. ($*P < 0.05$). c. Representative images of RagA co-localization with the HA-LysoTag. Data are \pm s.e.m. 20-30 analyzed myotubes from 3 independent experiments ($*P < 0.05$). d. Representative immunoblots of RagA and RagC following GTP-pulldown assays. Data are \pm s.d. from 3 independent experiments ($*P < 0.05$). e. Representative immunoblots of RagA knockdown and expression of RagA gain (Q66L) or loss of function (R37P and T21N) mutations in Mtm1-KO^{Cas9} muscle cells. Data are \pm s.d. from 3 independent experiments. ($*P < 0.05$). f. Impact of RagA loss (ShRNAs, R37P and T21N) and gain of function (Q66L) on Mtm1-KO^{Cas9} cell differentiation (myotube area and percentage of multinucleated myotubes). Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20-30$ myotubes were analyzed ($*P < 0.05$). Scale bar, 100 μ m. g. Volcano plot of comparative Lyso proteomics showed enrichment of RAGULATOR/LAMTOR-Rag complex in Mtm1-KO^{Cas9} Lyso-IP myotubes. Data are from 3 dependent experiments ($*P < 0.01$). h. Representative images showing Lamtor1-3 enrichment on the lysosome (HA-tagged Lyso) in nutrient depleted myotubes (4h, HBSS). Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20-30$ myotubes were analyzed ($*P < 0.05$). Scale bar, 20 μ m.

Extended data Fig.4



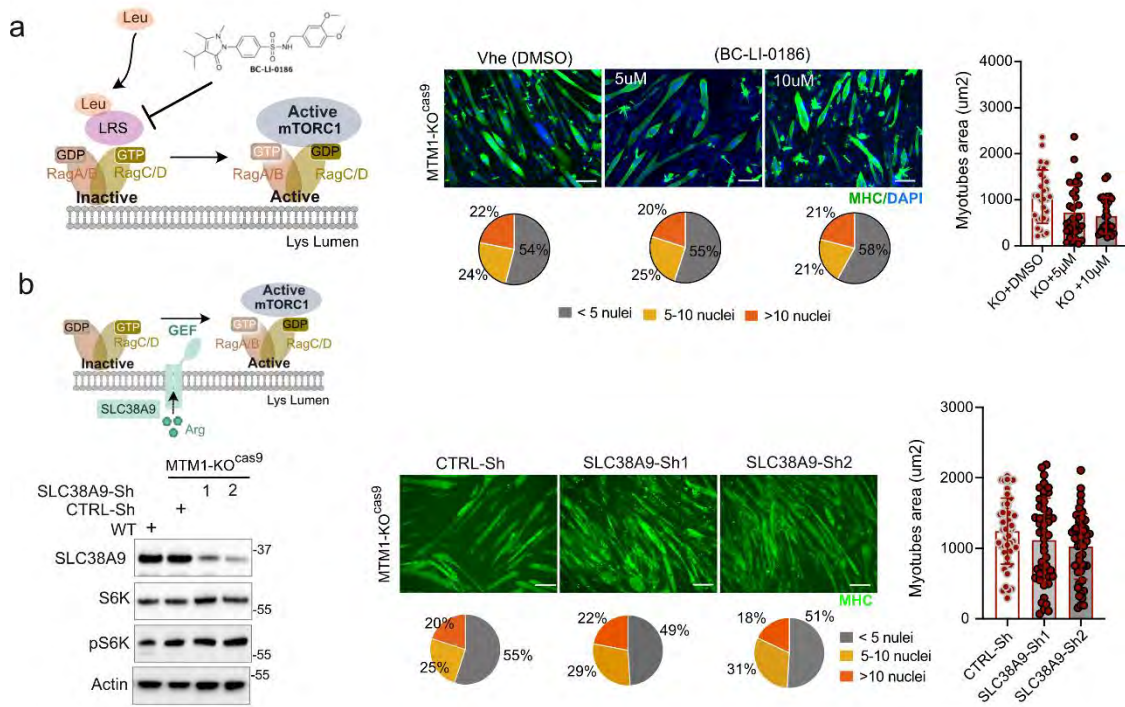
Extended data Fig.4 | Characterization of MTM1-KO^{Cas9} cell model. a. Representative images of mTOR/Lyso (CD63) co-localization in CTRL and XLCNM myotubes cultured in differentiation medium (2%HS). Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20-30$ myotubes were analyzed (* $P < 0.05$). Scale bar, 20 μm . b. Characterization of C2C12 MTM1-KO^{Cas9} cell line (CRISPR/Cas9). Representative immunoblots from 2 independent experiment showing MTM1 protein level and mTORC1 downstream targets (p-S6K) in MTM1-KO^{Cas9} compared Mtm1 knockdown cells (ShRNA). Violin plots showed protein synthesis rate measurement in MTM1-KO^{Cas9} compared to CTRL/WT myotubes (9 days). Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20-30$ myotubes were analyzed (* $P < 0.05$). c. Representative images of MHC (Myosin Heavy Chain) immunostaining in CTRL and MTM1-KO^{Cas9} and assessment of differentiation capacity in MTM1-KO^{Cas9} (myotube area, percentage of multinucleated myotubes and fusion index). Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 30-50$ myotubes were analyzed (* $P < 0.05$). Scale bar, 100 μm .

Extended data Fig.5



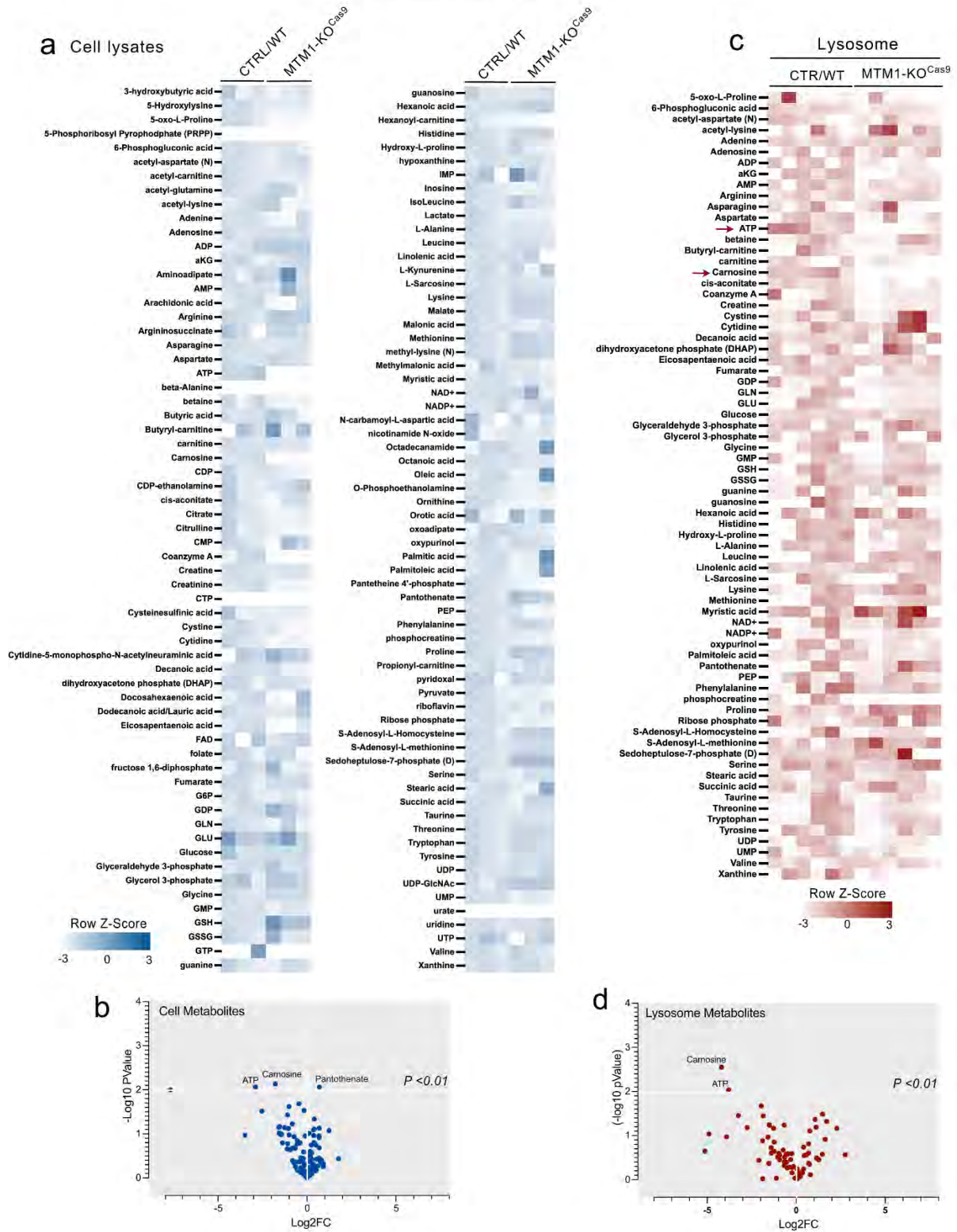
Extended data Fig.5 | Generation and characterization of Lyso-Tag MTM1-KO^{Cas} muscle cells. a. Representative images of Lyso-Tag (3XHA-TMEM192) CTRL and MTM1-KO^{Cas} myotubes and colocalization of Lyso-Tag and the lysosomal marker CD63. Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20-30$ myotubes were analyzed (* $P < 0.05$). Scale bar, 20 μm . b. Representative SIM image of Lyso-Tag labelling in CTRL myotubes and Lyso-IP quality control assessment using organelle marker. Representative immunoblots from two independent experiments. Scale bar, 1 μm . c. Impact of Lyso-Tag expression on Lysosome number, size and distribution in CTRL vs. MTM1-KO^{Cas9}. Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20-30$ myotubes were analyzed (* $P < 0.05$). d. Impact of Lyso-Tag expression on degradative capacity (Cathepsin D and B/L activities). Data are \pm s.d. from 3 independent experiments. e, f. Representative confocal images of Lyso-Tag co-localization with mTOR in CTRL and MTM1-KO^{Cas9} cultured in differentiation medium (2%HS), nutrient depleted medium (4h HBSS) and in the presence of IGF or amino acid cocktail. Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20-30$ myotubes were analyzed (* $P < 0.05$). Scale bar, 20 μm .

Extended data Fig.6



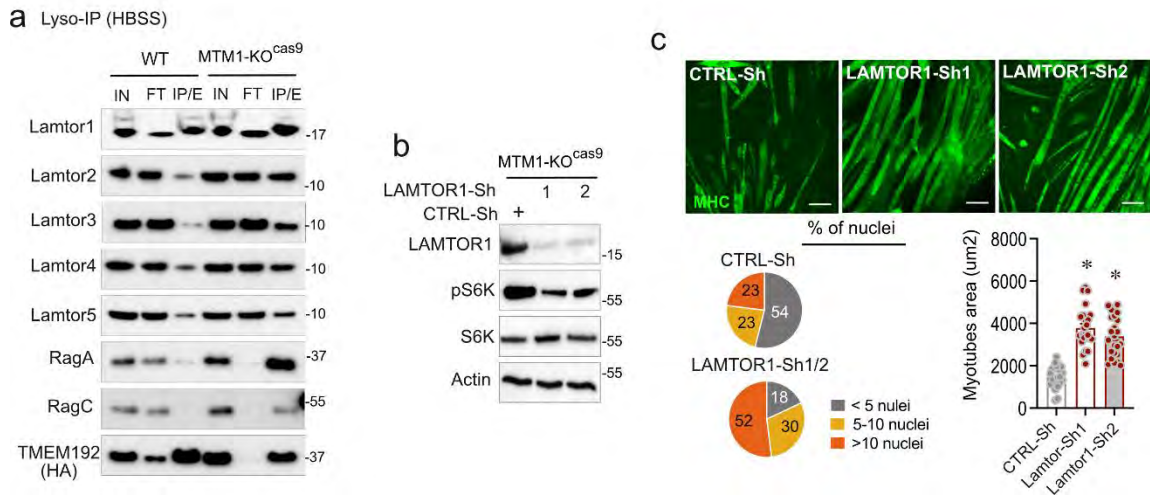
Extended data Fig.6 | Cellular and lysosomal amino acid fluxes is not impacted in MTM1-KO^{Cas9} myotubes. a. Inhibition of the Leu-transporter, Leucyl-tRNA synthetase (LRS) by the BC-LI-0186 component did not improve cell differentiation in MTM1-KO^{Cas9} model. Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20-30$ myotubes were analyzed. Scale bar, 100 μ m. b. Representative immunoblots of ShRNA mediated knockdown of SLC38A9 in MTM1-KO^{Cas9}. SLC38A9 knockdown did not improve myotube phenotype of MTM1-KO^{Cas9}. Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 30-50$ myotubes were analyzed. Scale bar, 100 μ m.

Extended data Fig.7



Extended data Fig. 7 | Cell and Lys metabolite analysis (untagged metabolic profile) in MTM1-KO^{Cas9}. a, b. Heatmap and volcano plot of cell metabolite comparison between CTRL and MTM1-KO^{Cas9}. Data are from 3 independent samples analyzed in one experiment. c, d. Heatmap and volcano plot of lysosomal metabolite (Lyso-IP) comparison between CTRL and MTM1-KO^{Cas9}. Data are from 3 independent cell and lysosome preparations ($* < 0.01$).

Extended data Fig.8



Extended data Fig.8 | LAMTOR-RagGTPase complex is enriched in MTM1-KO^{Cas9} Lysosomes. a. Representative immunoblots of LAMTOR-RagA/C complex detection in Lyso-IP from CTRL and MTM1-KO^{Cas9} myotubes. Data are from 2 independent experiments. b. Representative immunoblots of the impact of LAMTOR1 knockdown (ShRNA) on mTORC1 downstream phosphotarget (p-S6K). Data are from 2 independent experiments. c. Representative images of MHC stained myotubes of MTM1-KO^{Cas9} where *Lamtor1* was silenced (shRNAs) and the impact on cell phenotype (percentage of multinucleated myotubes and myotube area). Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20-30$ myotubes were analyzed (* $P < 0.05$). Scale bar, 100 μm . (* $P < 0.05$).

MTM1 controls a lysosomal phosphoinositide pool that modulates RagGTPase-mTORC1 axis

MTM1 hydrolyze PI3P and PI3,5P2, two phosphoinositides that are present at the LE/lysosome membranes^{22,23} (Fig. 4a). Then we tested the link between MTM1 phosphatase activity and mTORC1 activity during muscle cell differentiation and *in vivo* in skeletal (muscle injury/regeneration to trigger *de novo* myofiber formation) (Fig. 4b). Ectopic expression of the MTM1 dead-phosphatase mutant (MTM1-C375S) in XLCNM cell models or in Mtm1-KO skeletal muscle (Adeno-associated virus AAV-mediated expression) did not restore global protein translation, mTORC1 overactivation and differentiation in both experimental models (Fig. 4c and Extended Data Fig. 9a-d). Then, we addressed PI3P and PI3,5P2 localization in LysoTag MTM1-KO^{Cas9} myotubes using protein domain probes (2XFyve domain of HRS to detect PI3P and ML1N, WD40 domain of ATG18 and RAPTOR domains to detect PI3,5P2) (Fig. 4d and Extended Data Fig. 9e). In contrast to PI3P, the PI3,5P2 probes failed to give specific signal in our model (Extended Data Fig. 9e). We therefore tested and fully characterized an anti-PI3,5P2 antibody using PIKfyve inhibitor Apilimod (Extended Data Fig. 9f). Of note, PIKfyve is a type III PI5-kinase that produces the major cellular pool of PI3,5P2. Indeed, our localization data indicate a significant enrichment of PI3P and PI3,5P2 on the Lysosomal membrane in LysoTag MTM1-KO^{Cas9} myotubes (Fig. 4d). In support to these data, we employed mass spectrometry strategy to measure and quantify the entire PIPsome²⁴: phosphoinositides (PIs) and their derivatives (LPI, DAG and InositolPIs) in whole myotube homogenates (Fig. 4e,f and Extended Data Fig. 10a-d) as well as in purified lysosomes (Lyso-IP) (Fig. 4e,f and Extended Data Fig. 11a,b). This strategy allows in-depth cartography of PIPs, their derivatives and isomers (composition of fatty acid chains) of each lipid. Our analysis showed that loss of function of MTM1 did not have any obvious effect on LPI, DAG and InositolPIs, while PIs analysis revealed specific variation of MTM1 substrates (Fig. 4e,f and Extended Data Fig. 10 a-d). As a proof of the robustness of our strategy, cellular PIs analysis indicate a cellular content of PI entities (Extended Data Fig. 10d) similar to what was reported using ³²P radiolabeled cells^{25,26}. Consistently, loss of MTM1 impacted the level of its substrates (PI3P and PI3,5P2) and products (PI and PI5P) but not the other PIs. Particularly, we detected a higher level of PI3P isomer PI3,5P2 isomers 38:3 (stearic/arachidonic acid: 3 saturations) accompanied by a drop in PI and PI5P isomers 38:3-PI and 38:3-PI5P suggesting that MTM1 have preferential hydrolysis function toward this isomer (Extended Data Fig. 10d). Then we applied the same strategy to measure PIs on Lyso-IP samples (Fig. 4e,f and Extended Data Fig. 10a,b). Indeed, except PI which were not detected in CTRL LysoIP samples, PIPsome analysis revealed the presence of all PIs, with great enrichment of PI4,5P2, PI3,4P2 and PI4P (Fig. 4e,f and Extended Data Fig. 11a,b). We detected MTM1 substrates (PI3,5P2 and PI3P) in MTM1-KO^{Cas9} Lyso-IP preparations with around four time excess of PI3,5P2 in comparison to PI3P (certainly as a result of rapid conversion mechanism of PI3P by the lysosomal type III PI5-kinase PIKfyve) (Fig. 4e,f and Extended Data Fig. 11a,b). Consistent with whole cell analysis, MTM1-KO^{Cas9} Lysosomal PIPsome showed a higher level of 38:3 isomers of PI3P and PI3,5P2 accompanied by a drop in 38:3 PI5P isomer, while the level of the other PIs was not affected (Fig. 4f and Extended Data Fig. 11b). Furthermore, supporting a link between lysosomal PI3P and PI3,5P2 and mTORC1, we targeted MTM1 to the lysosome (LysoTag fusion protein TMEM192-MTM1 and MTM1C375S inactive phosphatase)

in MTM1-KO^{Cas9} cells (Extended Data Fig. 12a). The LysoTag-MTM1-WT expression restored mTORC1 signaling and improved myotube phenotype while the dead-phosphatase mutant failed to correct these parameters (Extended Data Fig. 12a,b). Previous immunodetection experiments showed an ER/SR distribution of MTM1 in skeletal muscle²⁷⁻²⁹ and given the established role of ER-Lysosome membrane contacts in lysosome homeostasis³⁰, we tested a possible implication of MTM1 in ER-Lysosome contacts. We employed PLA (proximity ligation assay) using Lyso-Tag antibody (HA) and the ER protein NOGO/RTN4. Our data indicate that loss of MTM1 alter the ER-Lysosome contacts (Extended Data Fig. 12c) suggesting a role of MTM1 and lysosomal phosphoinositides in ER-lysosome crosstalk to modulate RagGTPase-mTORC1 signaling.

To further investigate the lysosomal PI3P and PI3,5P2 metabolism and its connection to mTORC1 in XLCNM context, we modulated PI-kinases that produces these PIs. Notably, our LysoIP proteomic data showed the presence of the class III PI3-kinase (Vps34/PI3KC3) and the class II PI3-kinase (PI3KC2b), two kinases that produce the major and a minor cellular pool of PI3P, respectively. The type III PI5-kinase PIKfyve was also present in our Lyso proteome and the level of these kinases were not affected in MTM1-KO^{Cas9} lysosomes. Then we used the compound IN1 to inhibit Vps34, shRNAs to knockdown *PI3KC2b* and Apilimod to inhibit PIKfyve. Indeed, Vps34 inhibition did not impact mTORC1 activity neither muscle differentiation in MTM1-KO^{Cas9} cells (Extended Data Fig. 13a,b). In contrast, PI3KC2b genetic inhibition decreased mTORC1 signaling and improved muscle cell differentiation (fusion index and myotube area) in *Mtm1*-KO^{cas} myotubes (Extended Data Fig. 13c-f). PIKfyve inhibition had mild but positive effect on mTORC1 activity and myotube phenotype possibly because of an increase in PI3P levels (Extended Data Fig. 13d-f). Consistently, PI3KC2b inhibition restored cellular PI3P and PI3,5P2 in MTM1-KO^{Cas9} myotubes while PIKfyve inhibition increased PI3P (Extended Data Fig. 13g). Taken together these data revealed a novel phosphoinositide conversion cascade involving MTM1, PI3KC2b and PIKfyve to control lysosomal PI3P and PI3,5P2 and mTORC1 signaling during muscle differentiation.

A major function of phosphoinositides within the cell is to recruit and bind effector to trigger signaling events^{22,23}. Then we attempted to identify which component RagGTPase-mTORC1 could interact with PI3P or/and PI3,5P2. As RAGULATOR/LAMTOR(1-5) complex was highly enriched in our LysoIP from *Mtm1*-KO^{cas} cells (Fig. 3g), we tested LAMTORs and RagGTPase binding to phosphoinositides (Fig. 4g). We detected specific binding of LAMTOR1 to PI3P and LAMTOR3 to both PI3P and PI3,5P2 (Extended Data Fig. 14a-c). Phosphoinositides has preferential binding affinity toward positively charged amino acid (Lys/K, Arg/R, His/H). Then we explored structural models of LAMTOR-RagA/C complex to identify potential LAMTOR1/3 binding sites (Fig. 4h). We focused on the LAMTOR complex interface with the lysosomal membrane and identified two Lys (K103 and K104) on LAMTOR1, two Lys (K6 and K34) and one Arg (R7) on the LAMTOR3 (Fig. 4h). Then we mutated these amino acids into Alanine/A and tested their binding capacity toward PI3P and PI3,5P2 (Fig. 4i). Of note all the tested mutations (single and double) did not affect LAMTOR-RagA/C complex assembly in cultured cells (Extended Data Fig. 14d). Phosphoinositide-LAMTORs interaction experiments indicate that K103 and K104 amino acids were required for LAMTOR1-PI3P binding (Fig. 4i and Extended Data Fig. 14e). For LAMTOR3, the K6/R7 motif was required for both PI3P and PI3,5P2 binding while the K34A mutation abrogate

LAMTOR3 binding to PI3,5P2 but not to PI3P (Fig. 4i [Extended Data Fig.14e](#)). Collectively, these data revealed a functional connection between lysosomal phosphoinositide and RAGULATOR-RagGTPase activity.

Fig.4

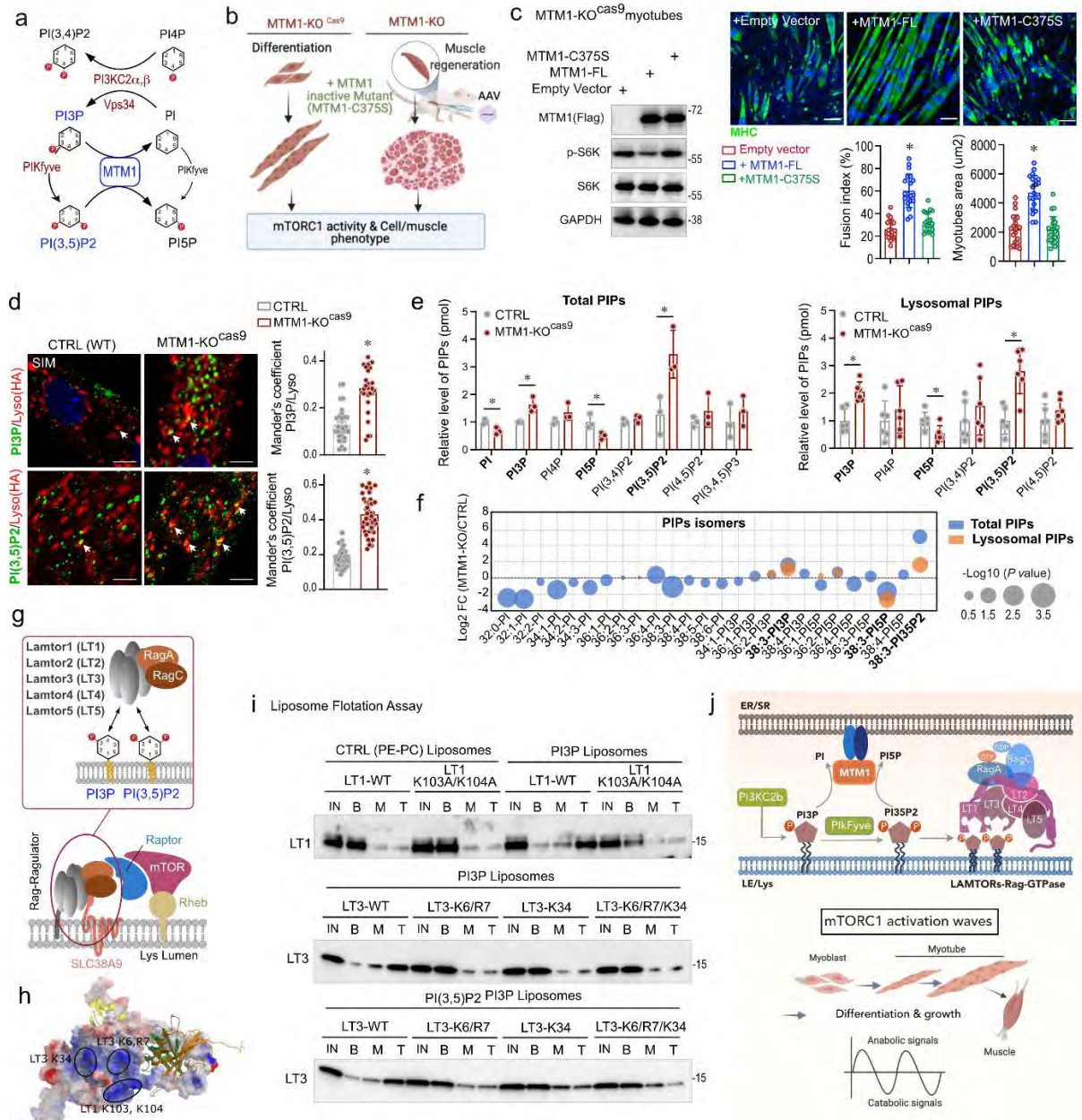
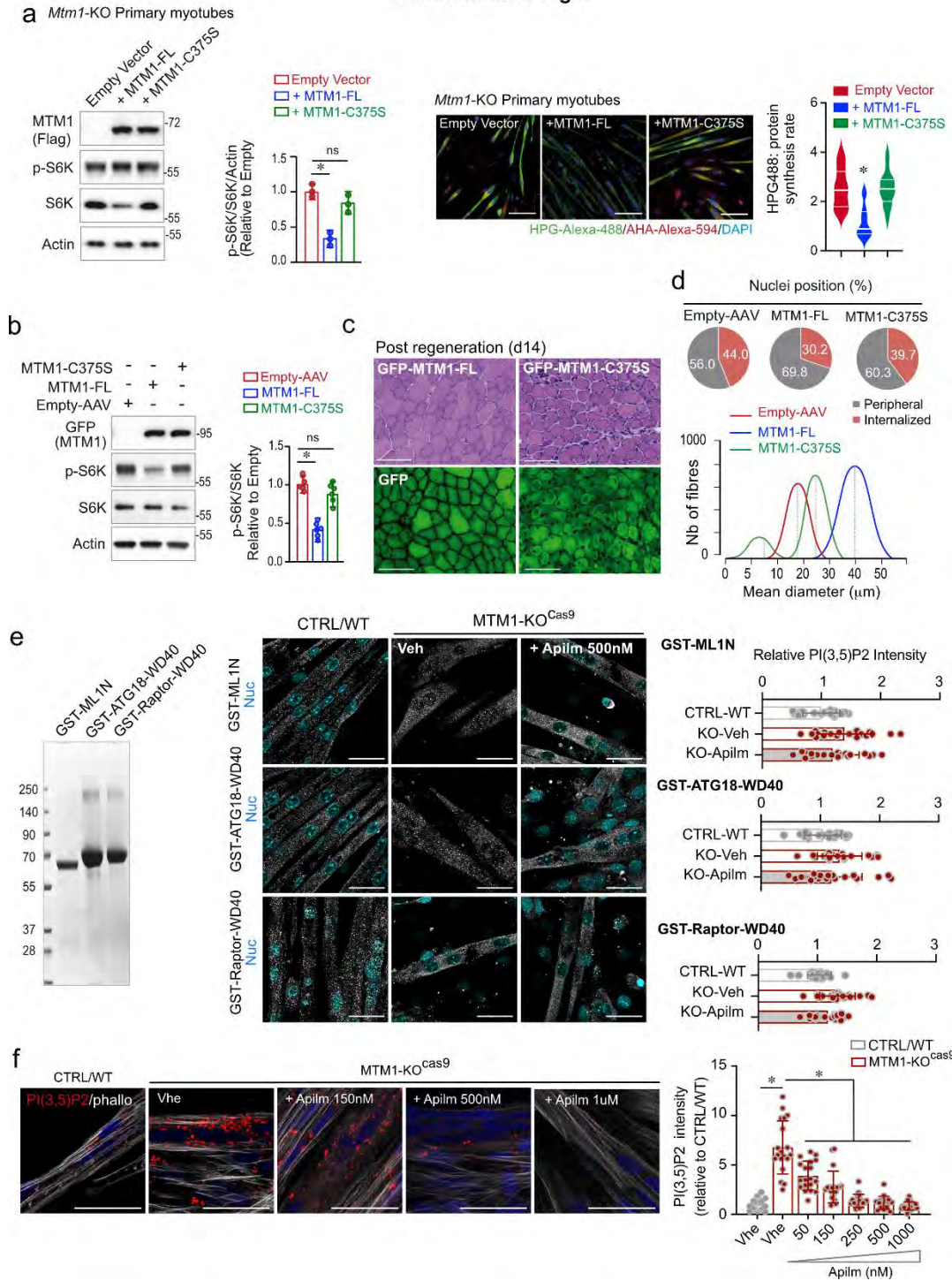


Fig. 4 | LAMTOR-RagGTPase axis is modulated by MTM1 activity through a binding of LAMTOR1 and LAMTOR3 to phosphoinositides. **a**. PI3P and PI(3,5)P₂ conversion cycle involving MTM1, PI3Ks (PI3KC2 β /Vps34) and the PI5K PlkFyve. **b**. Experimental strategy employed to address the impact of MTM1 loss of function (dead-phosphatase mutant) on muscle cell differentiation in cell model and in vivo following muscle damage and regeneration. **c**. Effect of ectopic expression MTM1 dead-phosphatase mutant (MTM1-C375S) in MTM1-KO *Cas9* cells on mTORC1 signaling and myotube phenotype. Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20-30$ myotubes were analyzed ($* P < 0.05$). Scale bar, 100 μm . **d**. representative image of PI3P and PI(3,5)P₂ colocalization with Lyso-Tag (HA). Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20-30$ myotubes were analyzed ($* P < 0.05$). Scale bar, 20 μm . **e,f**. Cellular and lysosomal PIPsomes (phosphoinositide content) comparison between CTRL and MTM1-KO *Cas9*. Plot map of cellular and lysosomal PI, PI3P, PI5P and PI(3,5)P₂ isomers in CTRL vs. MTM1-KO *Cas9*. Data are \pm s.e.m from 3 independent preparations for cell PIPsomes and 6 independent preparations for Lyso PIPsomes were analyzed ($* P < 0.05$). **g,h**. Lamtor complex (LT1-5) anchors RagGTPase to the lysosomal surface and possible connection with MTM1 substrates: PI3P and PI(3,5)P₂. Modeling of Lamtor complex showed hydrophobic motifs (positively charged amino acid) on LAMTOR1 (LT1) and LT3 in contact with the lysosomal membrane. **i**. Representative immunoblots of LT1 and LT3 (WT and mutants) flotation assays with PI3P and PI(3,5)P₂ napped liposomes. Targeting single or double amino acid substitutions of the

positively charged amino acids depleted LT1 and LT3 binding to PI3P and PI(3,5)P₂. Data are from 2 independent experiments. j. MTM1 substrates, PI3P and PI3,5P₂, bind two Lamtors (LT1 and LT3) and control amino-acid sensitive axis (RagGTPase) of mTORC1 during myogenesis and muscle growth.

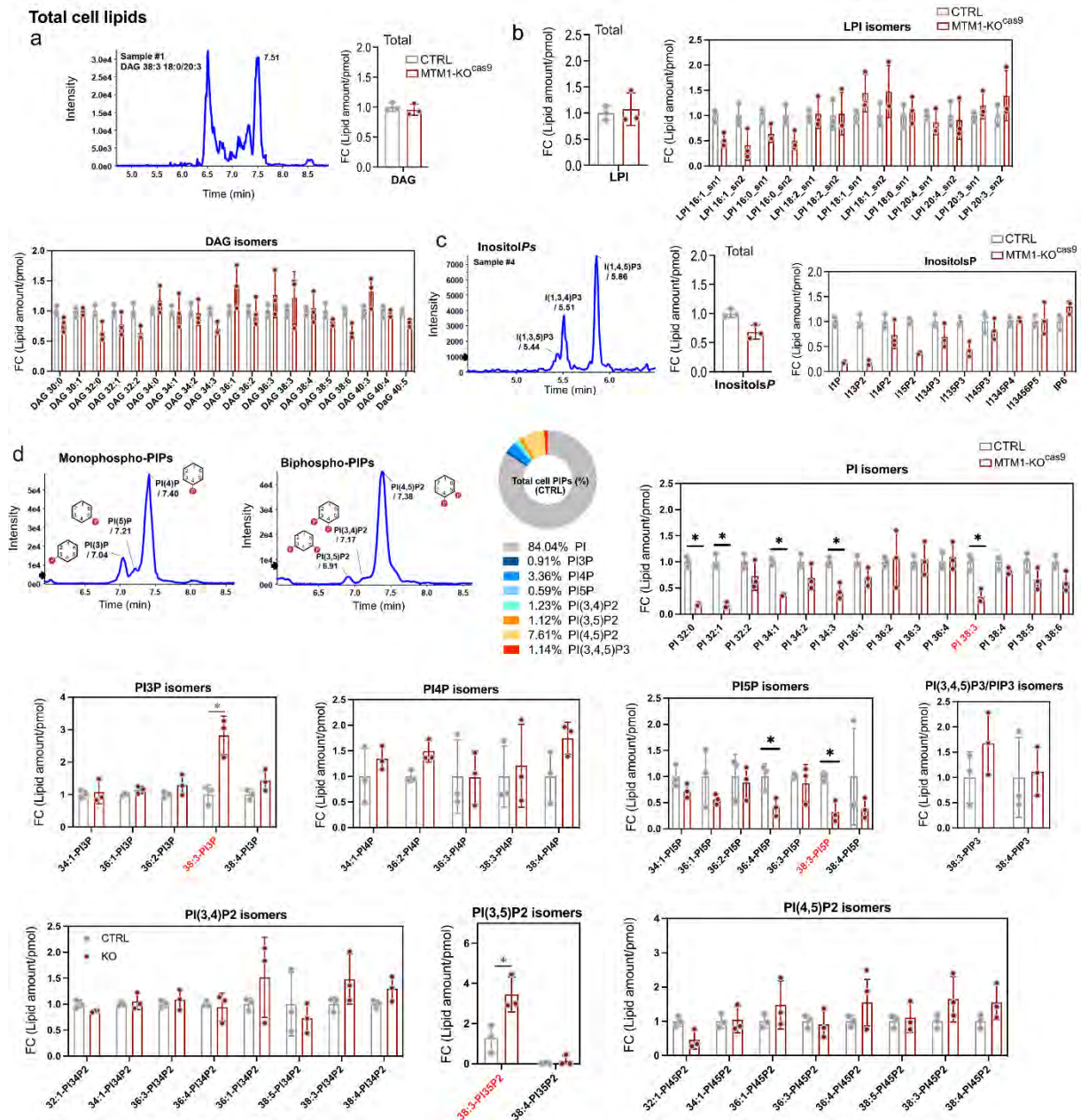
Extended data Fig.9



Extended data Fig.9 | MTM1 phosphatase activity is required for mTORC1 activity and muscle cell differentiation. a. Representative immunoblots and images showing ectopic expression of MTM1 dead phosphatase mutant (MTM1-C375S) in *Mtm1*-KO primary cells and its impact on mTORC1 signaling (p-S6K) and protein synthesis rate (HPG signal). Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20$ -30 myotubes were analyzed ($* P < 0.05$). Scale bar, 100 μm . b. Representative immunoblots of AAV-MTM1 (FL and C375S mutant) ectopic expression in skeletal muscle following muscle damage and its impact on mTORC1 signaling. Data are \pm s.e.m from 5-6 analyzed mice ($* P < 0.05$). c. Representative images of muscle (TA) morphology (H&E) and GFP-MTM1 (FL and C375S) in regenerating muscle. Scale bar, 200 μm . d. Nuclei position and muscle fiber diameter distribution following GFP-MTM1 (FL and C375S) expression in *Mtm1*-KO regenerating muscle. Data are \pm s.e.m from 5-6 analyzed mice. e. Recombinant protein domains (ML1N, ATG18-WD40 and Raptor-WD40) known

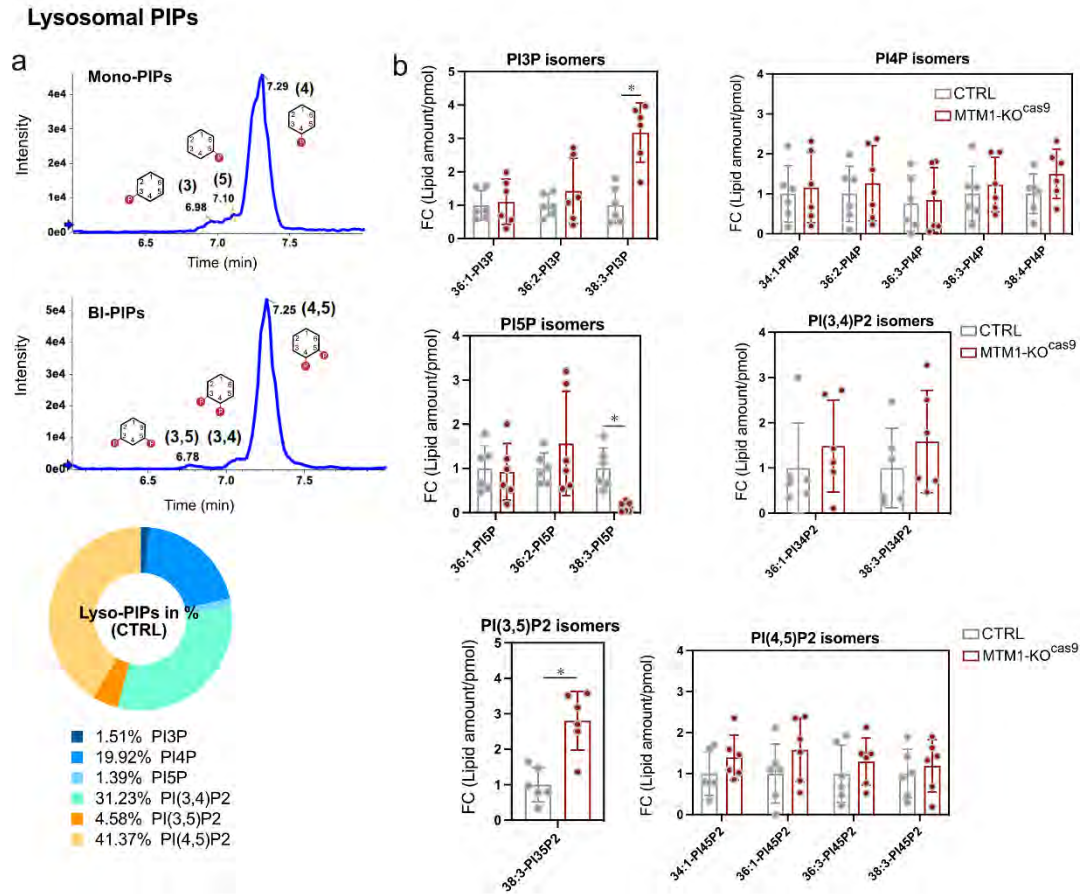
to bind and detect anti-PI(3,5)P2 in other cell types. Representative images of PI(3,5)P2 detection on myotubes using protein domain probes. Apilimod/Apilm (PIKFyve inhibitor) treatment was employed to address protein domain specificity toward PI(3,5)P2. Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20$ -30 myotubes were analyzed. Scale bar, 100 μm . f. Characterization of anti-PI(3,5)P2 antibody using increasing concentration of Apilimod. Data are \pm s.d. from 3 independent experiments where $n = 20$ -30 myotubes were analyzed (* $P < 0.05$). Scale bar, 20 μm .

Extended data Fig. 10



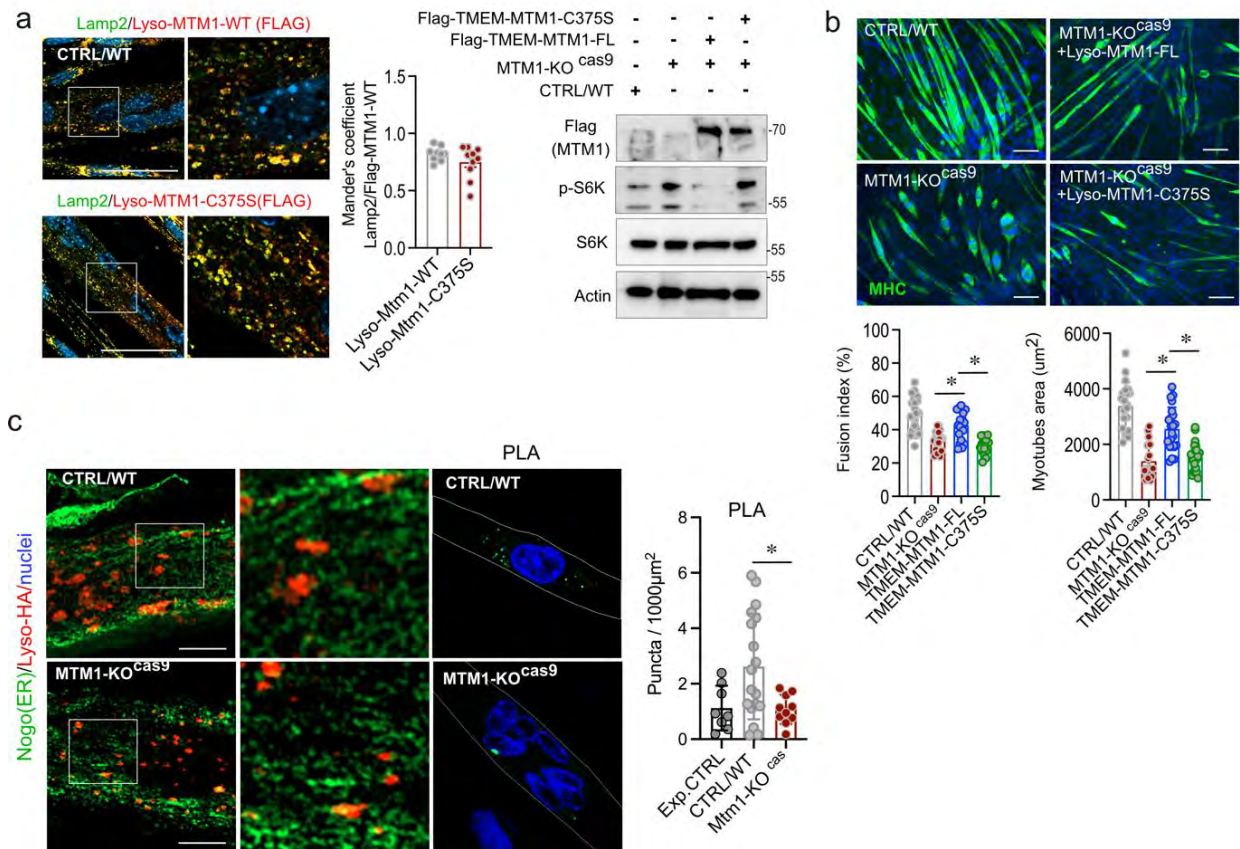
Extended data Fig. 10 | Cellular PIPsome (PIs and derivatives) analysis by mass spectrometry in 9 days myotube homogenates. a. Mass spectrometry profile and measurement of total and individual isomers of DAG (Diacylglycerol) in CTRL vs. MTM1-KO^{Cas9} myotubes. b. LPIs (Lysophosphatidylinositols) measurement of total and individual isomers in CTRL vs. MTM1-KO^{Cas9} myotubes. c. Mass spectrometry profile and measurement of total and individual Inositol phosphates in CTRL vs. MTM1-KO^{Cas9} myotubes. d. Mass spectrometry profile of monophosphorylated and biphosphorylated phosphoinositides and cellular content (%) of the seven phosphoinositides in CTRL myotube extracts. Relative level of individual PI and their isomers in CTRL vs. MTM1-KO^{Cas9} myotubes. MTM1 substrates and product are colored in red. For all lipid measurements data are \pm s.d. from 3 independent myotube preparations (* $P < 0.05$).

Extended data Fig.11



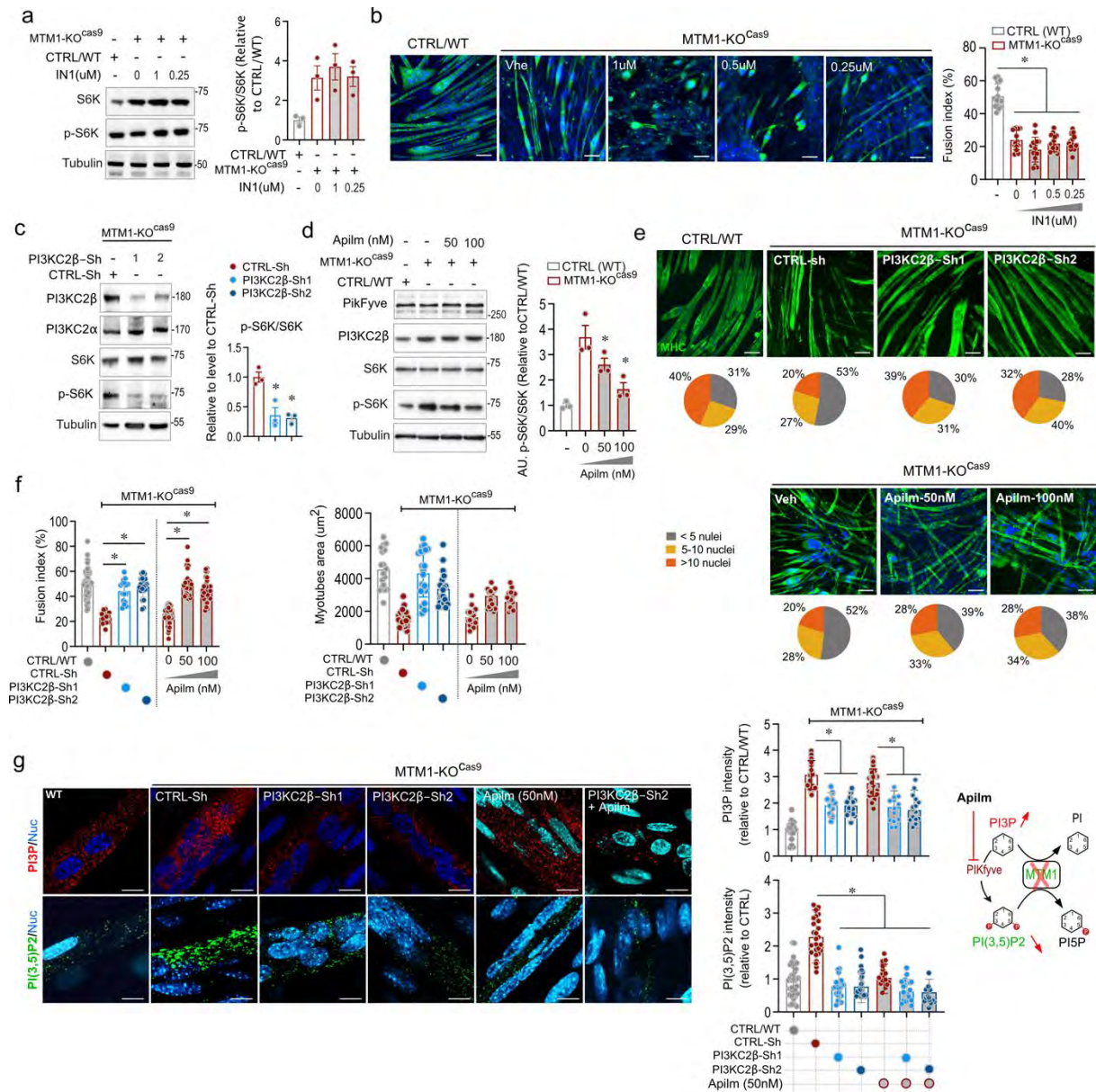
Extended data Fig.11 | PIPsome analysis by mass spectrometry in Lyso-IP samples. a. Mass spectrometry profile of monophosphorylated and biphosphorylated phosphoinositides and cellular content (%) of the six detected phosphoinositides in CTRL Lyso-IP samples. b. Relative level of individual PI and their isomers in CTRL vs. MTM1-KO^{Cas9} Lyso-IP. MTM1 substrates and products are colored in red. For all lipid measurements data are \pm s.d. from 6 independent Lyso-IP preparations (* $P < 0.05$).

Extended data Fig.12



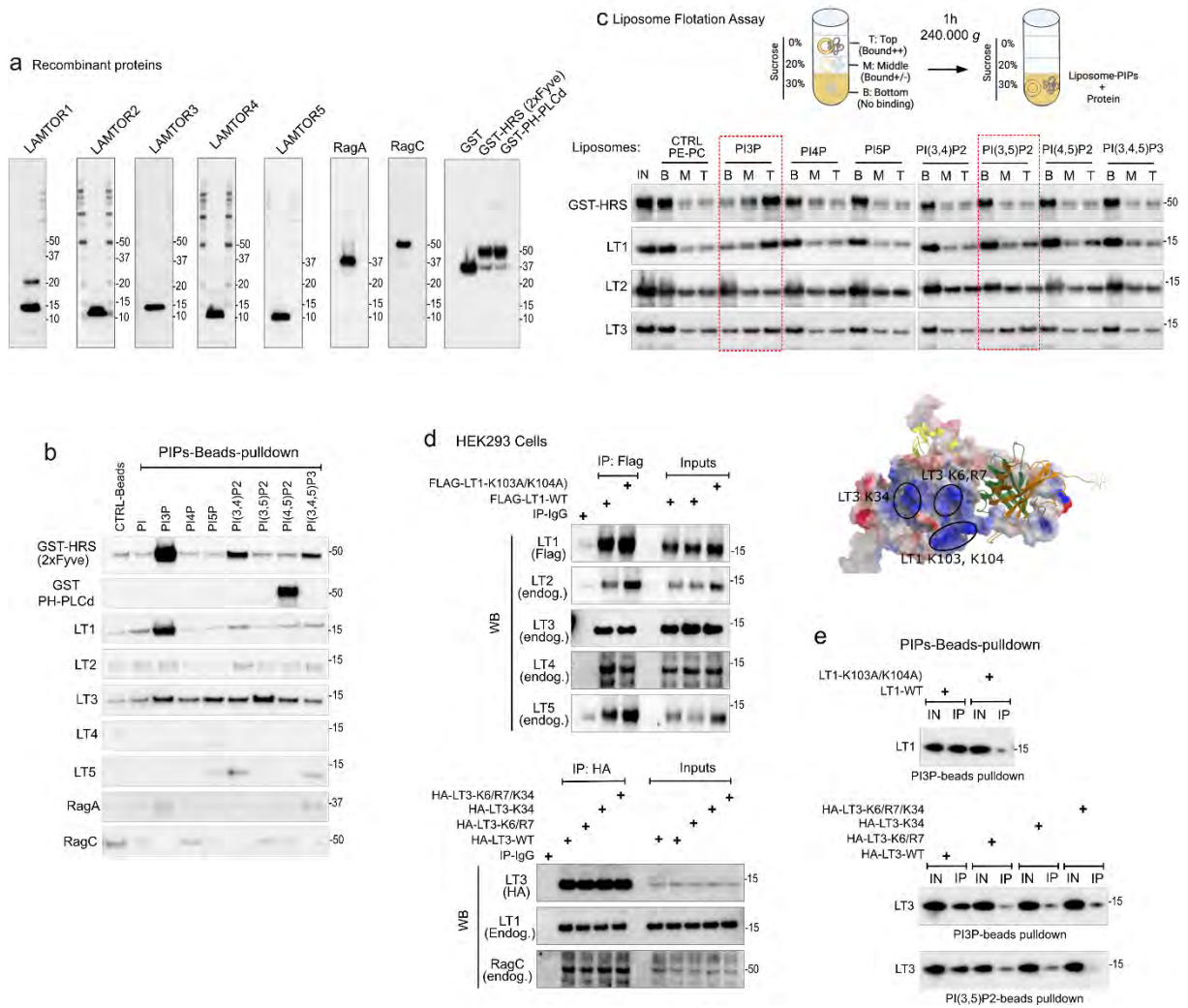
Extended data Fig.12 | MTM1 modulate lysosomal phosphoinositides possibly through ER-Lysosome membrane contact sites. a. Representative confocal images of targeting MTM1 (WT/FL and dead phosphatase mutant C375S) re-expression to the lysosome (Lyso-MTM1) in MTM1-KO^{Cas9} myotubes. Colocalization with the lysosomal marker Lamp2. Data are \pm s.d. from 2 independent assays where $n = 10-12$ myotubes were analyzed. Scale bar, 100 μm . Representative immunoblots (2 independent experiments) of the impact of Lyso-MTM1-WT and Lyso-MTM1-C375S on mTORC1 downstream signaling (p-S6K) in MTM1-KO^{Cas9} myotubes. b. Representative images of MHC stained myotubes expressing Lyso-MTM1-WT and Lyso-MTM1-C375S and the impact on cell differentiation capacity (fusion index). Data are \pm s.d. from 3 independent assays where $n = 20-30$ myotubes were analyzed ($*P < 0.05$). Scale bar, 100 μm . c. Representative confocal images of Lysosome (HA) and ER network (Nogo) contacts in CTRL vs. MTM1-KO^{Cas9} myotubes. Lyso-ER contact sites were measured by Proximity Ligation Assay (PLA) using anti-HA and anti-Nogo antibodies. Data are \pm s.d. from 3 independent assays where $n = 10-20$ myotubes were analyzed ($*P < 0.05$). Scale bar, 20 μm .

Extended data Fig. 13



Extended data Fig. 13 | MTM1 integrates a phosphoinositide conversion cascade involving PI3KC2β and PIKfyve to maintain physiological lysosomal PI3P and PI(3,5)P2 and muscle cell differentiation. a. Representative immunoblots of the impact of Vps34 inhibition (IN1) on mTORC1 downstream signaling (p-S6K). Data are ± s.d. from 3 independent assays (**P* < 0.05). b. Representative images of IN1 treatments on MTM1-KO^{cas9} differentiation capacity (fusion index). Data are ± s.d. from 3 independent assays where n = 20-30 myotubes were analyzed (**P* < 0.05). Scale bar, 100 μm. c. Representative immunoblots of the impact of PI3KC2β knockdown (two shRNAs) on mTORC1 downstream signaling in MTM1-KO^{cas9} myotubes. Data are ± s.d. from 3 independent assays (**P* < 0.05). d. Representative immunoblots of PIKfyve inhibition (Apilmod/Apilm) on mTORC1 downstream signaling in MTM1-KO^{cas9} myotubes. Data are ± s.d. from 3 independent experiments (**P* < 0.05). e-f. Representative MHC labeled myotubes showing the impact of PI3KC2β knockdown and Apilm treatments on differentiation capacity (nuclei number per myotube, index of fusion and myotube area) of MTM1-KO^{cas9} myotubes. Data are ± s.d. from 3 independent experiments where n = 20-30 myotubes were analyzed (**P* < 0.05). Scale bar, 100 μm. g. Representative confocal images of PI3P and PI(3,5)P2 staining on 9 days myotubes MTM1-KO^{cas9} to address the effect of PI3KC2β knockdown (shRNA) or/and PIKfyve inhibition (Apilm) on PI3P and PI(3,5)P2 levels in MTM1-KO^{cas9} cells. Data are ± s.d. from 3 independent experiments where n = 20-30 myotubes were analyzed (**P* < 0.05). Scale bar, 10 μm.

Extended data Fig. 14



Extended data Fig. 14 | PI3P and PI(3,5)P2 bind to LAMTOR1 and LAMTOR3. a. Representative immunoblots of purified LAMTOR-RagA/C recombinant protein and phosphoinositide binding domain probes. GST-HRS binds PI3P and GST-PH-PLCd binds to PI(4,5)P2 are experimental CTRLs. b. Representative immunoblots (2 independent experiments) of PIP-beads binding assays to LAMTOR-RagA/C recombinant proteins. c. Representative immunoblots (2 independent experiments) of liposome flotation assay toward LAMTOR1 (LT1) and LAMTOR3 (LT3). Discontinuous red rectangles showed positive LT1 and LT3 binding to PI3P and PI(3,5)P2. IN, Input; B, Bottom fraction; M, Middle fraction and T, Top (bond) fraction. d. Representative immunoblots (2 independent experiments) of the impact of LT1 and LT3 mutation within the positively charged motifs (indicated in blue on the LT1-LT3 structure modeling) on LAMTOR-Rag complex formation in HEK293 cells. e. Representative immunoblots (2 independent experiments) of the impact of LT1 and LT3 mutations on PI3P and PI(3,5)P2 binding addressed by PIPs-Beads pulldown assay.

Discussion

How lipid composition of Lys membrane impacts organelle assigned functions is merely started to be explored. Here we show that two phosphoinositides (PIs), PI3P and PI3,5P2, are essential to control amino-acid sensitive axis of mTORC1 during muscle growth. The level of these lipids is controlled by the PI3-phosphatase MTM1, a protein missed in congenital myopathy³¹ (Fig. 4j). Phosphoinositides are involved in several aspect of lysosome homeostasis, including channel function and more recently membrane repair^{22,32-35}. Phosphoinositide-metabolizing enzymes controls the upstream growth factor sensing axis of mTORC1 (PI3K/AKT/TSC1/2 cascade) through the production of PtdIns(3,4,5)P3 or PtdIns(3,4)P2 at the plasma membrane^{36,37} while other organelle phosphoinositides could enhance the repression activity of TSC complex activity toward mTORC1³⁸. Moreover, under the stress of growth factor deprivation, the proliferative cells use the non-essential PI3KC2b which produces a pool of PtdIns(3,4)P2 that causes mTORC1 inhibition by sequestering Raptor within a PtdIns(3,4)P2-14-3-3g complex³⁹. Our data indicate that the knockdown of PI3KC2b in Mtm1-KO^{cas} differentiated cells produced a reverse effect on mTORC1 and this is mediated by the other product of PI3KC2b, PI3P. This was accompanied by almost complete rescue of muscle cell phenotype in XLCNM cell models, which is consistent with previous in vivo observation on genetic repression of PI3KC2b in MTM1-KO mice model. These data support the development of specific PI3KC2b inhibitors for therapeutic perspectives in XLCNM.

Our observations indicate that the accumulation of MTM1 lipid substrates and the retention of LAMTOR-RagGTPase complex on the lysosome surface is sufficient to induce mTORC1 activation even in nutrient depleted condition. How such activation is maintained during differentiation process and in skeletal muscle is still an open question that require future studies. One possibility is that MTM1-KO muscle cells exhaust amino acids pools released from catabolic processes such as autophagy or from TCA cycle intermediate, a recently proposed mechanism of nutrients channeling between the Lys and the mitochondria⁴⁰. In line with this, previous observations in XLCNM model pointed on defective autophagy associated with mitochondrial dysfunction.

As many studies on PI metabolizing enzymes, there is still limitation to assign a particular cellular localization of these enzymes certainly due to their high dynamicity. Nevertheless, based on previous observation in skeletal muscle we demonstrated that targeting MTM1 in the Lys was able to restore mTORC1 signaling and muscle cell phenotype in XLCNM model. Consistently, loss of function of MTM1 disrupted Lyso-ER MCSs (membrane contact sites) suggesting that MTM1 is required to maintain functional interconnection between both compartments at least to modulate mTORC1 signaling. Although additional studies are needed to explore the role of MTM1 in ER-organelle MCSs in particular in muscle system where two extensive ER and SR network co-exist.

Increasing evidences implicates a decline in lysosomal integrity and function in many diseases including those involving PI-metabolizing enzymes (neurogenerative, cancer and metabolic diseases)^{1,41,42}. Indeed, proteomic and untargeted metabolomic profiling of isolated lysosomes coupled to our novel approach to address lipidomic/PIPsome provide a framework for future integrative studies into how lysosome composition is involved in human disease mechanism and physiopathology. Importantly,

in vivo LysoIP method on tissue using Lyso-Tag mouse model was recently proposed ⁴³, which further offer multiple opportunities to study Lys function and its connection to disease physiology.

References

- 1 Zoncu, R. & Perera, R. M. Built to last: lysosome remodeling and repair in health and disease. *Trends Cell Biol* 32, 597-610, doi:10.1016/j.tcb.2021.12.009 (2022).
- 2 Sancak, Y. *et al.* Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290-303, doi:10.1016/j.cell.2010.02.024 (2010).
- 3 Liu, G. Y. & Sabatini, D. M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 183-203, doi:10.1038/s41580-019-0199-y (2020).
- 4 Sancak, Y. *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496-1501, doi:10.1126/science.1157535 (2008).
- 5 Inoki, K., Li, Y., Xu, T. & Guan, K. L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 17, 1829-1834, doi:10.1101/gad.1110003 (2003).
- 6 Menon, S. *et al.* Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell* 156, 771-785, doi:10.1016/j.cell.2013.11.049 (2014).
- 7 Saucedo, L. J. *et al.* Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol* 5, 566-571, doi:10.1038/ncb996 (2003).
- 8 Bar-Peled, L. *et al.* A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science* 340, 1100-1106, doi:10.1126/science.1232044 (2013).
- 9 Panchaud, N., Peli-Gulli, M. P. & De Virgilio, C. Amino acid deprivation inhibits TORC1 through a GTPase-activating protein complex for the Rag family GTPase Gtr1. *Sci Signal* 6, ra42, doi:10.1126/scisignal.2004112 (2013).
- 10 Shen, K. *et al.* Architecture of the human GATOR1 and GATOR1-Rag GTPases complexes. *Nature* 556, 64-69, doi:10.1038/nature26158 (2018).
- 11 Petit, C. S., Rocznik-Ferguson, A. & Ferguson, S. M. Recruitment of folliculin to lysosomes supports the amino acid-dependent activation of Rag GTPases. *J Cell Biol* 202, 1107-1122, doi:10.1083/jcb.201307084 (2013).
- 12 Tsun, Z. Y. *et al.* The folliculin tumor suppressor is a GAP for the RagC/D GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Mol Cell* 52, 495-505, doi:10.1016/j.molcel.2013.09.016 (2013).
- 13 Shen, K. *et al.* Cryo-EM Structure of the Human FLCN-FNIP2-Rag-Ragulator Complex. *Cell* 179, 1319-1329 e1318, doi:10.1016/j.cell.2019.10.036 (2019).
- 14 Shen, K., Choe, A. & Sabatini, D. M. Intersubunit Crosstalk in the Rag GTPase Heterodimer Enables mTORC1 to Respond Rapidly to Amino Acid Availability. *Mol Cell* 68, 821, doi:10.1016/j.molcel.2017.10.031 (2017).
- 15 Hnia, K., Clausen, T. & Moog-Lutz, C. Shaping Striated Muscles with Ubiquitin Proteasome System in Health and Disease. *Trends Mol Med* 25, 760-774, doi:10.1016/j.molmed.2019.05.008 (2019).
- 16 Zhao, J. *et al.* FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* 6, 472-483, doi:10.1016/j.cmet.2007.11.004 (2007).
- 17 Hnia, K., Vaccari, I., Bolino, A. & Laporte, J. Myotubularin phosphoinositide phosphatases: cellular functions and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 18, 317-327, doi:10.1016/j.molmed.2012.04.004 (2012).
- 18 Abu-Rmaleh, M. *et al.* Lysosomal metabolomics reveals V-ATPase- and mTOR-dependent regulation of amino acid efflux from lysosomes. *Science* 358, 807-813, doi:10.1126/science.aan6298 (2017).
- 19 Son, K. *et al.* Nontranslational function of leucyl-tRNA synthetase regulates myogenic differentiation and skeletal muscle regeneration. *J Clin Invest* 129, 2088-2093, doi:10.1172/JCI122560 (2019).
- 20 Yoon, M. S. *et al.* Leucyl-tRNA Synthetase Activates Vps34 in Amino Acid-Sensing mTORC1 Signaling. *Cell Rep* 16, 1510-1517, doi:10.1016/j.celrep.2016.07.008 (2016).
- 21 Shen, K. & Sabatini, D. M. Ragulator and SLC38A9 activate the Rag GTPases through noncanonical GEF mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 9545-9550, doi:10.1073/pnas.1811727115 (2018).
- 22 Bilanges, B., Posor, Y. & Vanhaesebroeck, B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 515-534, doi:10.1038/s41580-019-0129-z (2019).

- 23 Posor, Y., Jang, W. & Haucke, V. Phosphoinositides as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, doi:10.1038/s41580-022-00490-x (2022).
- 24 Li, P. & Lammerhofer, M. Isomer Selective Comprehensive Lipidomics Analysis of Phosphoinositides in Biological Samples by Liquid Chromatography with Data Independent Acquisition Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem* 93, 9583-9592, doi:10.1021/acs.analchem.1c01751 (2021).
- 25 Steinfeld, N., Giridharan, S. S. P., Kauffman, E. J. & Weisman, L. S. Simultaneous Detection of Phosphoinositide Lipids by Radioactive Metabolic Labeling. *Methods Mol Biol* 2251, 1-17, doi:10.1007/978-1-0716-1142-5_1 (2021).
- 26 Hale, A. T., Clarke, B. P. & York, J. D. Metabolic Labeling of Inositol Phosphates and Phosphatidylinositols in Yeast and Mammalian Cells. *Methods Mol Biol* 2091, 83-92, doi:10.1007/978-1-0716-0167-9_7 (2020).
- 27 Amoasii, L. *et al.* Phosphatase-dead myotubularin ameliorates X-linked centronuclear myopathy phenotypes in mice. *PLoS Genet* 8, e1002965, doi:10.1371/journal.pgen.1002965 (2012).
- 28 Amoasii, L. *et al.* Myotubularin and PtdIns3P remodel the sarcoplasmic reticulum in muscle in vivo. *J Cell Sci* 126, 1806-1819, doi:10.1242/jcs.118505 (2013).
- 29 Royer, B. *et al.* The myotubularin-amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO Rep* 14, 907-915, doi:10.1038/embor.2013.119 (2013).
- 30 Lim, C. Y. *et al.* ER-lysosome contacts enable cholesterol sensing by mTORC1 and drive aberrant growth signalling in Niemann-Pick type C. *Nat Cell Biol* 21, 1206-1218, doi:10.1038/s41556-019-0391-5 (2019).
- 31 Amoasii, L., Hnia, K. & Laporte, J. Myotubularin phosphoinositide phosphatases in human diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* 362, 209-233, doi:10.1007/978-94-007-5025-8_10 (2012).
- 32 Li, X., Garrity, A. G. & Xu, H. Regulation of membrane trafficking by signalling on endosomal and lysosomal membranes. *J Physiol* 591, 4389-4401, doi:10.1113/jphysiol.2013.258301 (2013).
- 33 Marchant, J. S. & Patel, S. Two-pore channels at the intersection of endolysosomal membrane traffic. *Biochem Soc Trans* 43, 434-441, doi:10.1042/BST20140303 (2015).
- 34 Rodgers, S. J., Jones, E. I., Mitchell, C. A. & McGrath, M. J. Sequential conversion of PtdIns3P to PtdIns(3,5)P2 via endosome maturation couples nutrient signaling to lysosome reformation and basal autophagy. *Autophagy*, 1-3, doi:10.1080/15548627.2022.2124499 (2022).
- 35 Tan, J. X. & Finkel, T. A phosphoinositide signalling pathway mediates rapid lysosomal repair. *Nature* 609, 815-821, doi:10.1038/s41586-022-05164-4 (2022).
- 36 Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J. & Cantley, L. C. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* 10, 151-162, doi:10.1016/s1097-2765(02)00568-3 (2002).
- 37 Tee, A. R., Manning, B. D., Roux, P. P., Cantley, L. C. & Blenis, J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberlin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol* 13, 1259-1268, doi:10.1016/s0960-9822(03)00506-2 (2003).
- 38 Fitzian, K. *et al.* TSC1 binding to lysosomal PIPs is required for TSC complex translocation and mTORC1 regulation. *Mol Cell* 81, 2705-2721 e2708, doi:10.1016/j.molcel.2021.04.019 (2021).
- 39 Marat, A. L. *et al.* mTORC1 activity repression by late endosomal phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate. *Science* 356, 968-972, doi:10.1126/science.aaf8310 (2017).
- 40 Jouandin, P. *et al.* Lysosomal cystine mobilization shapes the response of TORC1 and tissue growth to fasting. *Science* 375, eabc4203, doi:10.1126/science.abc4203 (2022).
- 41 Murley, A., Wickham, K. & Dillin, A. Life in lockdown: Orchestrating endoplasmic reticulum and lysosome homeostasis for quiescent cells. *Mol Cell*, doi:10.1016/j.molcel.2022.08.005 (2022).
- 42 Guerrero-Navarro, L., Jansen-Durr, P. & Cavinato, M. Age-Related Lysosomal Dysfunctions. *Cells* 11, doi:10.3390/cells11121977 (2022).
- 43 Laqtom, N. N. *et al.* CLN3 is required for the clearance of glycerophosphodiester from lysosomes. *Nature* 609, 1005-1011, doi:10.1038/s41586-022-05221-y (2022).

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the AFM (association Française contre les myopathies) for financial support, KH-JV (#23101) and MP PhD fellowship (#22115). We are also grateful to Myotubular Trust, KH&MP (#20_INSERM_HNIAK), the ANR-PRC (MusCLY 2021-2024) (KH & GP) and ANR France Relance program (ANR-21-PRRD-0002-01) for financial supports. We are also grateful to our supervisory tutorship: INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale) and University of Paul Sabatier, Toulouse. We warmly thanks all the B. Payratre Lab for their support and the technical platforms of the I2MC (Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases). OS are supported by the **“Proteomics French Infrastructure” (ANR-10-INBS-08)** and **the “Fonds Européens de Développement Régional Toulouse Métropole and the Région Midi-Pyrénées”**. P.L. gratefully acknowledges the support from the China Scholarship Council (grant number 201807060010). M.L. acknowledges the support by the German Research Foundation (DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft, 374031971-TRR 240).

Materials & Methods

Muscle primary cells (human and mouse)

XLCNM (1 and 2) primary muscle cells and CTRLs were obtained from the French muscle dystrophy association (AFM: Association contre la myopathie) myobank (AFM-Myobank) after clinical and genetic diagnosis. XLCNM1 and 2 carry EX5del and c.141-144delAGAA, respectively, leading to complete loss of MTM1 expression as confirmed by western blot analysis (Extended data Fig1C). XLCNM and CTRL Myoblast were maintained in proliferation medium: Dulbecco medium supplemented with 20% FCS (Fetal calf serum) and antibiotics (0.1% Penicillin-Streptomycin) until reaching 60-70% confluency. Medium was replaced every two days. Induction of cell differentiation to myotubes were performed by adding the differentiation medium (Dulbecco medium + 2% HS, horse serum, 0.1% penicillin-streptomycin). For mouse primary cells primary muscle cells (satellite cells) were isolated from mouse pups (2-3 weeks) hindlimbs according to Falcone et al ¹. Cells were maintained in proliferation medium for 3-4 days to reach 60-70% confluency and then shifted to a differentiation medium for 9-10 days. For lentivirus expression of MTM1-WT and MTM1C375S construct in Mtm1-KO primary cell myoblasts (60-70% confluency) were infected with the indicated lentiviral preparation and maintained in proliferation medium for 48h. Myoblasts expressing the construct of interest were selected by adding 2 µg/ml of puromycin (SIGMA) for 24h. Differentiated medium (supplemented with 1 µg/ml of puromycin) was added to induces myotube formation. For the culture procedure medium was replaced every 2 days.

Cell lines

C2C12 mouse muscle cell line (NCBI Biosample: SAMEA2224966) were cultured in the same proliferation (myoblast) and differentiation (myotube) mediums. Muscle cells used in this study were analyzed at the indicated stage through the manuscript (Myoblast, 3 to 9 days of differentiation).

For Mtm1-KO Cas9 cell line was validated and characterized by Mansat et al. (Under review). Briefly, CRISPOR webtool was used to design gRNAs targeting Mtm1. C2C12 line were electroporated with Cas9-sgRNA RNP targeting exon 8 of *Mtm1* gene using the Neon transfection system (Life Technologies). 12.5 pmol of recombinant Cas9 (encoding plasmid was a gift from Jennifer Doudna, University of California, Berkeley/HHMI) were incubated with 75 pmol of sgRNA synthesized using the EnGen sgRNA Synthesis Kit (New England Biolabs) from the template oligonucleotide (TAATACGACTCACTATAGGTCATCATCTGAGGTCGGATAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG) and purified with the RNA clean & concentrator-25 kit (Zymo research). SgRNA-Cas9 RNP complex was incubated 10 minutes at RT then mixed and electroporated (1650V, 10 ms, 3 pulses) into 100 000 cells. After cell plating in proliferation medium for 24h, cells were detached (accutase, BD biosciences) and pelleted. Part of cell pellet was tested for genomic editing and the remaining part was plated in 96 plates to obtain one single cell/well (FACS sorting). Genomic DNA was isolated using the GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) and a 638-bp region surrounding the predicted site of Cas9 activity was amplified. Edition efficiency was verified using the T7 endonuclease assay according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs). The 638-bp region was analyzed in the selected clones using the TIDE webtool (Tracking of Indels by Decomposition) to identify clones with frameshift mutations. The isolated positive clones were further characterized by sequencing predictive off-targets (CRISPOR prediction tool) and the absence of MTM1 protein in comparison to shRNA-Mtm1 expressing C2C12. For cell starvation, myotubes were cultured with HBSS (-amino acid, glucose and growth factors) for 4h or stimulated with HBSS medium containing 2X amino acid cocktail without L-glutamine (50X stock solution SIGMA) or with 40 ng/ml of Rat IGF1 (ThermoFisher scientific) for 4h.

Finally, for LAMTORs mutation expression, the Human Embryonic Kidney HEK-293T cells were used. 50-60 confluent HEK-293T in 10 cm dish cells were transfected with the indicated cDNA mixed with the lipofectamine 2000 reagent (ThermoFisher scientific) and Opti-pep medium (SIGMA) according to manufacturer's recommendations. After 24 hours, cells were washed twice with PBS and cultured for 36 hours with Dulbecco medium supplemented with 10% FCS (Fetal calf serum) and antibiotics (0.1% Penicillin-Streptomycin). When reached 80-90 confluence, cells were rinsed twice with PBS and

collected for further analysis (immunoprecipitation or/and western blot). All cells were validated to be free of mycoplasma contamination before use.

siRNA and shRNA-mediated gene knockdown

For congenital myopathie gene slicing the self-penetrating Accell siRNA (customized SMARTpool library, Dharmacon) was used according to manufacturer's recommendation. Control siRNA we used (2-scrambled siRNAs and 1 siRNA targeting *Gapdh* (A-040917-14-0005, Dharmacon). The efficacy of gene silencing was verified by RT-qPCR using 96 plates (Triplicate) containing custom primer couples for the 36 analyzed genes. Two couple of primers for the housekeeping genes (*Hprt1* and *Rplp0*) were used for normalization. RT-quantitative PCR was performed according to routine protocol of RNA extraction and reverse transcription with the iScript Reverse transcription Supermix (Bio-Rad) and used at 1:100 dilution for quantitative PCR followed by quantitative PCR (qPCR) reaction using the iTaq SYBR Green Supermix (Bio-Rad). The analysis was performed using on Light-Cycler 480 instruments (Roche). Experiments were performed in triplicate independent experiments.

For shRNA gene knockdown, pLKO.1-puro vectors encoding shRNA (Mission shRNA) were obtained from SIGMA (validated shRNA). Vector particles were produced as previously described². C2C12 cells were transduced by incubation with lentiviral particles for 48h proliferation medium in the presence of 2 µg/ml of puromycin (SIGMA) for cell selection. After reaching 60-70% confluency, transduced myoblasts were differentiated as previously mentioned with differentiation medium in the presence of 1 µg.ml⁻¹ puromycin. Mission mouse shRNA (SIGMA) used in this study trigger *Raga* (NM_178376, shRNA1; TRCN0000305245, shRNA2: TRCN0000305246), *Slc38A9* (NM_178746, shRNA1:TRCN0000101971, shRNA2: TRCN0000101974), *Lamtor1* (NM_025605, shRNA1:TRCN0000121343, shRNA2: TRCN0000121346), and *Pik3c2b* (NM_001099276, shRNA1:TRCN0000360942, shRNA2: TRCN0000360889). shRNA targeting *Mtm1* were generated and characterized previously (ref). SHC003 and SHC016 (Sigma-Aldrich) were used as a control.

Drugs treatments of cells

Myotube were treated with HPG488 and then with inhibitors targeting nutrient signaling and translational machinery starting form 5 days post induction of differentiation to ovoid interference with first steps of differentiation process. Treatment was performed daily for 3 days and protein synthesis rate (HPG-488 signal) and differentiation capacity (myotube size and nuclei number per myotube) was addressed. The following drugs were diluted in DMSO to obtain the appropriate concentration: the pan PI3Ks inhibitors Wortmannin (5 µM, W1628- SIGMA) and LY294002 (5 µM, L9908-SIGMA), the mTORC1-ATP competitors Torin1 (200nM, 475991-SIGMA) and AZD8055 (200nM, S1555- Selleckchem), the p70 ribosomal S6 kinase (S6K1) inhibitor PF-4708671 (10 µM, PZ0143-SIGMA), the eIF2α (eukaryotic translation initiation factor 2 α-subunit) inhibitor Slubrial (10 µM, SML0951-SIGMA), the selective blocker of Leucyl-tRNA synthetase (LRS; LeuRS) BC-LI-0186 (5-10 µM, SML2226-SIGMA), the Vps34 inhibitor IN1 (0.25-1µM, S7980-Selleck) and the Pikfyve inhibitor Apilimod (0.05-1µM, S0785-Selleck).

Protein synthesis measurement: HPG488/AHA-594 assay and puromycin incorporation

Measurement of protein synthesis rate was addressed by Click-iT® HPG (L-homopropargylglycine)-Alexa Fluor® Protein Synthesis Assays (Molecular Probes, life technologies) according to manufacturer's recommendation. HPG488 and AHA-594 amino acid analogues were used to measure total protein synthesis or de novo protein synthesis rate, respectively. Of note HPG488 showed higher incorporation capacity than the AHA-594. Both probes were incubated with cells (50 µM in L-serum-free medium) at the indicated stage of differentiation (myoblast or myotubes) for 2h. After PBS washing cells were fixed with 3.7% formaldehyde in PBS for 15 min at RT protected from light and permeabilized with 0.5% Triton® X-100 in PBS for 20 min at RT. Cell were incubated with nuclei staining (DAPI) solution for 10min and imaged with 20X objective in confocal microscope to have at least 9 fields per coverslip. Reconstituted fields were performed in CTRL and XLCNM cells using Image J software. For SUnSET SURface SEnsing of Translation) analysis in cell, puromycin (2 µg/ml) diluted in cell medium was incubated for 4h at 37°C and puromycin incorporation was detected by western blot using anti-

puromycin antibody (Merck, 12D10 clone). In vivo SUnSET in skeletal muscle was performed as previously described³. Briefly, mice were food deprived for 6h and then injected (IP injection) with puromycin (0.05 $\mu\text{mol/g}$ body mass). Tibialis anterior muscles were collected and frozen in 2-methylbutane-liquid nitrogen. Puromycin incorporation was measured on muscle fibers (8 μm transversal sections) using anti-puromycin primary antibody (Merck, 12D10 clone) and Alexa-Fluor-488 (Invitrogen) secondary antibody. A total of 4 WT and 4 Mtm1-KO mice and at least 5 sections from each muscle were imaged by confocal microscopy and fluorescent intensity was analyzed using ImageJ software.

Immunoprecipitation/IP and western blotting

For IP, cells were rinsed with ice-cold PBS and lysed with IP buffer (40 mM HEPES, pH 7.4, 5 mM MgCl_2 ; 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 10 mM Na β -glycerol phosphate; 1% Triton; and one tablet of protease inhibitor cocktail per 25 ml of lysis buffer). The cell lysates were cleared by centrifugation and protein concentration was measured to equilibrate all supernatant samples using Bradford assay (BioRad) and BSA standard ranges. 100 μl of each supernatant was mixed with 2XSDS buffer and left for the analysis (Input/IN fraction) and the remaining part were incubated with 80 μl of magnetic beads coupled to anti-FLAG or anti-HA antibodies (Pierce) pre-washed with IP buffer. Samples were incubated at 4 $^\circ\text{C}$ for two hours. Following immunoprecipitation, the beads were washed four time with IP buffer and two time with IP buffer supplemented with 300 mM NaCl. Immunoprecipitated proteins were denatured by 2XSDS buffer, resolved by SDS-PAGE, and analyzed by immunoblotting. For total lysates, Cells or muscles were homogenized with rotor-stator homogenizer using lysis buffer (50mM Tris-Cl pH 8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA) supplemented with 0.5 % Triton X100, PMSF (1mM), 10 mM Na β -glycerol phosphate and complete protease inhibitor tablet (SIGMA). Lysates were incubated in ice for 30 min and passed through a 25G syringe (20 times) twice and then cleared by centrifugation at 14,000 xg to obtain soluble supernatant fraction (S). Samples were equilibrated using Bradford assay (BioRad) and BSA standard ranges. Proteins were denatured by 2XSDS buffer (Laemmli buffer). Pellets were sonicated (40%power 10s pulses), mixed with 2X Laemmli buffer, boiled at 95 $^\circ\text{C}$ and centrifuged 14,000 xg to obtain insoluble fractions (P). denatured S and P fraction were mixed and approximately 30-50 μg of proteins were separated 4-12% gradient SDS-polyacrylamide gel (Life Technologies) and transferred on Immobilon-P or nitrocellulose membranes (Millipore). Protein of interest were revealed by specific primary antibodies (incubation O/N at 4 $^\circ\text{C}$) (See Table2 for antibodies used in this study) followed by 1h incubation with HRP-conjugated secondary antibodies. Protein bands were revealed by chemiluminescence (ChemiDoc MP, Bio-Rad Laboratories) with clarity western ECL substrate detection system (Bio-Rad Laboratories).

GTP-pulldown

The GTP loading activities of RagA and C were monitored by pull-down assay using GTP-agarose beads (Pierce). Myotubes (10 cm dishes) were washed with PBS, and cells were lysed in GTP-binding buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 supplemented with PMSF (1mM), 10 mM Na β -glycerol phosphate and complete protease inhibitor tablet (SIGMA). Cell homogenates were sonicated and centrifuged 10 min at 13,000 g at 4 $^\circ\text{C}$. Supernatant was collected and incubated 4 hours with precleared GTP-agarose beads. Beads were then washed with the GTP-binding buffer, and proteins were eluted by boiling in reducing 2XSDS buffer (Laemmli buffer). GTP bound fraction of RagA or RagC was analyzed immunoblotting.

Construct and cloning

Lentiviral and AAV1-MTM1 (FL and CS) constructs used in this study were previously described². MTM1-targeted expression on the Lysosome: pLV-Puro-UBC-TMEM192-MTM1(FL)-3XHA, pLV-Puro-UBC-TMEM192-MTM1(C375S)-3XHA (generated by Vectorbuilder), MTM1-targeted expression on the ER using the ER-specific targeting domain KDEL (pLJC5-3xFlag-MTM1-KDEL) or the TM domain of the ER protein MOSPD2 (aa493-515) pLJC5-3xFlag-TM-MTM1-3xFLAG and pLJC5-3xFlag-MTM1-TM-3xFLAG were generated by insertion of the MTM1 and ER-tag sequence in the pLJC5 vector backbone using the In-fusion kit (Takara Bio) according to the manufacturer's instructions (two insert

cloning). Lentiviral plasmid pLJM1-Flag-RagA (Addgene # #164357) were used to generate RagA mutants (RagA-Q66L, RagA-R37P, RagA-T21N) using In-fusion mutagenesis kit (Takara Bio). For phosphoinositide detection the following plasmids were used: pGEX-2TK-FYVE (HRS) were a gift from Mark Lemmon (Yale, U.S.A). pEGFP-MCOLN1 (Addgene #92419), p3E-ATG18 (Addgene #109556) and pRK5-myc-Raptor were used to subclone the MLN1 insert, WD40(1-5 repeats) of ATG18 (aa1-269), WD40 repeats of Raptor (aa 1013–1335) into pGEX-4T-1 (Pharmacia Biotech). For LAMTOR1 and LAMTOR3 constructs, the pRK5-LAMTOR1/p18-FLAG (Addgene #42331) and pRK5-HA-LAMTOR3/HBXIP (Addgene #42328) were used to generate PI-binding mutants (LAMTOR1-K103A/K104A, LAMTOR3-K6A LAMTOR3-K34 and LAMTOR3 double mutation K6A/K34A). LAMTOR1 and LAMTOR3 (WT and mutants) inserts were subcloned in pGEX-4T-1 to produce recombinant proteins. All primers used for cloning and mutagenesis are listed in Table1.

Protein purification

The pGEX-4T1-mCherry-FYVE(HRS) and pGEX-4T1-eGFP-FYVE(HRS), pGEX-4T1-ML1N, pGEX-4T1-ATG18-WD40, pGEX-4T1-Raptor-WD40 plasmids were transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). Single colony was used to prepare a starter culture that was expanded and grown at 37°C until O.D. 600 nm reaches 0.6–0.8. The expression of the recombinant proteins was induced with 0.5 mM IPTG overnight at 18°C. After centrifugation, bacterial pellets were lysed in a cold buffer containing 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM DTT, 10% glycerol containing protease inhibitor cocktail and 0.5 mg/ml lysozyme. Following sonication and centrifugation, proteins were purified with Glutathione-Sepharose 4B beads, eluted with 20 mM reduced glutathione, dialyzed, concentrated, and analyzed by SDS–PAGE and Coomassie staining.

For the Rag GTPase dimer expression and purification in bacteria, a pETDuet-1 vector encoding codon optimized, C-terminally His-tagged RagA and tagless RagC (pSK109) was transformed into BL21(DE3) protein expression and purification was performed as previously described ⁴. For Ragulator we used two batches of recombinant proteins provided by C. Kuang and L. A. Huber Labs, respectively ^{4,5}. Briefly, the first batches were purified by a similar approach to Yonehara et al. ⁶, where the five subunits of Ragulator were co-transformed and expressed in BL21(DE3) strain. Three duet-vectors were transformed sequentially: pETDuet-1:GST-LAMTOR1, pCOLADuet:LAMTOR2|LAMTOR3-His, and pACYCDuet:LAMTOR4|LAMTOR5/HBXIP. The resulting strain was grown in LB until optical density (OD) of the culture reached 0.4-0.6 (early log-phase), and then the temperature was lowered to 18°C. Half an hour later, the Ragulator complex was induced by 0.5 mM IPTG and expressed overnight. The bacterial pellets were resuspended in Resuspension Buffer (RB: 50 mM NaHEPES, pH 7.4; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 2 mM DTT; 0.5 mM PMSF; 0.01% Triton; 100 µg/ml lysozyme; 10 µg/ml DNase; and EDTA-free protease inhibitor). The mixture was stirred at 4°C for 30 minutes, before passing through the microfluidizer six times at a pressure of 18,000 psi. The cell lysate was cleared by centrifugation at 40,000×g for one hour. The supernatant containing soluble Ragulator was incubated with Glutathione resin for an hour, and the resin washed extensively in RB and RB supplemented with 300 mM NaCl. After buffer exchange into Buffer NB (50 mM NaHEPES, pH 7.4; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 0.5 mM TCEP; 0.01% Triton; 0.2 mM ATP), on-bead digestion was performed using thrombin at room temperature for an hour, and the flow-through was collected frozen in liquid nitrogen until use. The second batch of Ragulator-Rag proteins was purified as previously described ⁵. A synthetic gene comprising seven open reading frames (ORFs) including individual promoter (polh or p10) and terminator signals (SV40- or HSVtk-polyA signals) was designed as follows: The first ORF encoded for LAMTOR1 truncated by 21 N-terminal amino acids and an N-terminal protein GB1 domain tag to enhance its solubility and stability. The second ORF encoded for LAMTOR4 followed by ORFs encoding LAMTOR5, N-terminal 6x-histidine-tagged LAMTOR3, LAMTOR2, RagA, and RagC. In order to cleave the tags after purification, recognition sites for tobacco etch virus (TEV) protease were inserted N-terminal to the open reading frames. Each ORF was codon optimized for expression in *Spodoptera frugiperda* and flanked by unique restriction sites. The entire gene was chemically synthesized by GeneArt AG (Life Technologies) and was then inserted into the multiple cloning site of the acceptor vector pACEBac1, where it is flanked by Tn7 13 transposition elements. The initial recombinant

baculoviruses were amplified and used for induction of protein expression by infecting cells at a density of $0.5\text{--}1.0 \times 10^6$ cells/mL. Infection was performed with amplified virus stock at a multiplicity of infection (MOI) >1 . 72 to 96 hours after infection, cells were collected by centrifugation, washed in PBS and the cell pellet was resuspended in lysis buffer (20 mM HEPES pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT) and flash frozen in liquid nitrogen. After thawing the cells, the lysate was supplemented with protease inhibitor cocktail (cOmpleteTM, EDTA-free) and cleared by centrifugation at $16,000 \times g$ and 4°C for 30min. The soluble fraction was filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nitrocellulose membrane and loaded to a His-Trap FF column equilibrated in lysis buffer. The column was washed with 5 -10 column volumes (CV) of lysis buffer containing 25 mM imidazole and eluted in a buffer containing 20 mM HEPES pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, and 250 mM imidazole. The His-tag was cleaved using 200 μL of 1 mg/mL TEV protease overnight during dialysis (10 kDa MWCO) against 2L SEC-buffer (20 mM HEPES pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT). In order to separate the stoichiometric heptamer LAMTOR-RagA/C complex from the pentameric LAMTOR complex and residual TEV, SEC was performed using a Superdex 200 prep column equilibrated in 20 mM HEPES pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT. The fractions containing the heptameric or pentameric complex were pooled, concentrated and flash frozen in liquid nitrogen until use.

Lyso-Tag cell line and Lyso-IP

C2C12 (WT and Mtm1-KO Cas9) myoblast were infected with lentiviral preparation to express the LysoTag construct: pLJC5-Tmem192-3xHA (Addgene #102930) as described previously ⁷. Following selection, cells were differentiated into myotubes and lysoTag expression and specificity were verified by immunoblotting and immunofluorescence. Lysosome integrity (number, size and cell distribution) as well as proteolytic activity (Cathepsin D and B/L activity assay kit, Abcam) were checked in the new generated cell lines as previously described ⁷. For Lyso-IP, two 10 cm plates were used for each LysoIP. Due to the extensive membrane and cytoskeleton network in myotubes, we adapted the previously described protocol to this cell model. Briefly, 9 days myotubes were quickly rinsed twice with PBS and then scraped in one mL of KPBS (136 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, pH 7.25 was adjusted with KOH and centrifuged at $1000 \times g$ for 2 min at 4°C . Pelleted cells were resuspended in 1ml (50 μL of the total cell lysates was taken and adjusted with 2XSDS page for further processing of the whole-cell fraction, Inputs). The remaining cells were gently homogenized with 20 strokes (2 ml Dounce homogenizer) three time spaced with 2min incubation in ice. The homogenate was then centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min at 4°C and the supernatant containing the cellular organelles including lysosomes was incubated with 100 μL of KPBS prewashed anti-HA magnetic beads (SIGMA). We proceeded to Lyso-IP assay in our cell model using different time of incubation (10min, 20min, 30min, 1h, 2h and 4h) and notice that 2h incubation was optimum to co-purify lysosomes (3XHA-TMEM192 expression) with no contaminant organelles except very few ER membrane which are the most associated membrane network to the lysosome. Lyso-IP beads were then gently washed three times with KPBS and Lysosomes were eluted using 3 rounds of 10min elution with 2mg/ml HA peptide solution in KPBS (50ul). Eluted samples were equilibrated according to 3XHA-TMEM192 expression and analyzed by immunoblotting for organelle markers and mTORC1 complex or proceeded for proteomic, lipidomic or metabolomic analysis.

Immunofluorescence and imaging

For imaging analysis cell were plated on glass slides coated with 0.2 filtered and sterile gelatin (G9391 SIGMA) pre-incubated for 1h hours at 37°C . Myosin heavy chain (MHC) labelling was performed on myotubes fixed with 3.7% formaldehyde for 10 minutes at room temperature, quenched with 50 mM NH₄Cl for 10 minutes and permeabilized by 0.1% Triton X-100 in DPBS during 10 minutes. Following, 1 hour of saturation with 10% goat serum in DPBS, cells were incubated for 1h with antibodies (Table 2) and 1h with Alex488-coupled secondary antibodies (ThermoFisher), nuclei were stained with DAPI (Euromedex), and cells were washed and maintained in DPBS. Imaging was performed with the ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad laboratories). Myotube area, % of nuclei per myotube and index of fusion were addressed using ImageJ software and homemade plugins. For Lysosome and ER labelling as well as for phosphoinositides, cells were fixed with 3.7% formaldehyde, quenched with NH₄Cl for 10

minutes and permeabilized with 20 μ M Digitonin/PIPES-BS (PIPES 20 mM pH 6.8, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM) for 5 minutes. After saturation with 10% goat serum/PIPES-BS, cells were incubated with 50 μ g/ml of the GST-mCherry-FYVE-domain (HRS) probe (PI3P detection) and/or primary antibodies at room temperature or O/N at 4°C (see Table 2 for antibody dilution and incubation time). After 3 washes with PIPES-BS, secondary fluorescent antibodies in 10% goat serum/PIPES-BS were added for 1 hour, washed 3 times with PIPES-BS. Cells were then fixed a second time with 3.7% formaldehyde, nuclei were stained with DAPI, washed 3 times with DPBS, mounted with FluorSave reagent (Calbiochem). Imaging was performed with confocal microscopes LSM780 (Zeiss) or LSM900 (Zeiss) or Microscope Elvra PS.1 (Zeiss) for SIM images acquisition. Images were treated with Zen or ImageJ software to quantify fluorescence intensities or co-localization using Mander's split coefficients (named Mander's coefficients through the paper). This coefficient is proportional to the amount of fluorescence of the colocalizing pixels or voxels in each color channel.

Targeted LC-MS metabolomics analyses

For metabolomic analysis samples (3 total cell lysates from independent culture for each cell line or 6 LysoIP from independent experiments for each cell line) were equilibrated according to LysoTag expression (3XHA-TMEM192). The extraction solution (50% methanol, 30% acetonitrile (ACN) and 20% water) was added to the sample. The volume of the extraction solution was adjusted to lysosome content (1 ml per 100 μ l of eluted Lysosomes and 1ml cell pellet from 10cm dish). After addition of extraction solution, samples were vortexed for 5 min at 4 °C and centrifuged at 16,000g for 15 min at 4 °C. The supernatants were collected and stored at -80 °C until analysis. LC/MS analyses were conducted on a QExactive Plus Orbitrap mass spectrometer equipped with an Ion Max source and a HESI II probe coupled to a Dionex UltiMate 3000 uHPLC system (ThermoFisher). External mass calibration was performed using a standard calibration mixture every seven days, as recommended by the manufacturer. The 5 μ l samples were injected onto a ZIC-pHILIC column (150 mm \times 2.1 mm; i.d. 5 μ m) with a guard column (20 mm \times 2.1 mm; i.d. 5 μ m) (Millipore) for LC separation. Buffer A was 20 mM ammonium carbonate, 0.1% ammonium hydroxide (pH 9.2), and buffer B was ACN. The chromatographic gradient was run at a flow rate of 0.200 μ l min⁻¹ as follows: 0–20 min, linear gradient from 80% to 20% of buffer B; 20–20.5 min, linear gradient from 20% to 80% of buffer B; 20.5–28 min, 80% buffer B. The mass spectrometer was operated in full scan, polarity switching mode with the spray voltage set to 2.5 kV and the heated capillary held at 320 °C. The sheath gas flow was set to 20 units, the auxiliary gas flow to 5 units and the sweep gas flow to 0 units. The metabolites were detected across a mass range of 75–1,000 m/z at a resolution of 35,000 (at 200 m/z) with the automatic gain control target at 106 and the maximum injection time at 250 ms. Lock masses were used to ensure mass accuracy below 5 ppm. Data were acquired with Thermo Xcalibur software (ThermoFisher). The peak areas of metabolites were determined using Thermo TraceFinder software (ThermoFisher), identified by the exact mass of each singly charged ion and by the known retention time on the HPLC column. Analysis was performed using online software Metaboanalyst (McGill university). Heat maps were generated using Prism 9 software.

NanoLC-MS/MS analysis of lysosomal proteome

Analysis was performed on four independent Lyso-IP samples for each cell line. For each sample, dried protein extracts were solubilized with 25 μ l of 5% SDS. Proteins were submitted to reduction and alkylation of cysteine residues by addition of TCEP and chloroacetamide to a final concentration respectively of 10mM and 40mM. Protein samples were then processed for trypsin digestion on S-trap Micro devices (Protifi) according to manufacturer's protocol, with the following modifications: precipitation was performed using 211 μ l S-Trap buffer; 1 μ g Trypsin was added per sample for digestion, in 25 μ l ammonium bicarbonate 50mM pH7. Tryptic peptides were resuspended in 17 μ l of 2% acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid and analyzed by nano-liquid chromatography (LC) coupled to tandem MS, using an UltiMate 3000 system (NCS-3500RS Nano/Cap System; ThermoFisher Scientific) coupled to an Orbitrap QEx-Plus mass spectrometer (ThermoFisher Scientific). Each sample was loaded on a C18 precolumn (300 μ m inner diameter \times 5 mm, ThermoFisher Scientific) in a solvent

made of 2% acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid, at a flow rate of 20 μ l/min. After 5 min of desalting, the precolumn was switched online with the analytical C18 column (75 μ m inner diameter \times 50 cm, in-house packed with Reprosil C18) equilibrated in 95% solvent A (5% acetonitrile, 0.2% formic acid) and 5% solvent B (80% acetonitrile, 0.2% formic acid). Peptides were eluted using a 5%-50% gradient of solvent B over 105 min at a flow rate of 300 nl/min. The mass spectrometer was operated in data-dependent acquisition mode with the Xcalibur software. MS survey scans were acquired with a resolution of 70,000 and an AGC target of $3e6$. The ten most intense ions were selected for fragmentation by high-energy collision induced dissociation, and the resulting fragments were analysed at a resolution of 17500, using an AGC target of $1e5$ and a maximum fill time of 50ms. Dynamic exclusion was used within 30 s to prevent repetitive selection of the same peptide.

For Bioinformatics analysis raw MS files were processed with the Mascot software (version 2.7.0) for database search and Proline⁸ for label-free quantitative analysis (version 2.1.2). Data were searched against Mus musculus entries of the SwissProt protein database (release Swiss-Prot 20201022, Mus musculus 17.060 entries). Carbamidomethylation of cysteines was set as a fixed modification, whereas oxidation of methionine was set as variable modifications. Specificity of trypsin/P digestion was set for cleavage after K or R, and two missed trypsin cleavage sites were allowed. The mass tolerance was set to 10 ppm for the precursor and to 20 mmu in tandem MS mode. Minimum peptide length was set to 7 amino acids, and identification results were further validated in Proline by the target decoy approach using a reverse database at both a PSM and protein false-discovery rate of 1%. For label-free relative quantification of the proteins across biological replicates and conditions, cross-assignment of peptide ions peaks was enabled inside group with a match time window of 1 min, after alignment of the runs with a tolerance of \pm 600s.

Median Ratio Fitting computes a matrix of abundance ratios calculated between any two runs from ion abundances for each protein. For each pair-wise ratio, the median of the ion ratios is then calculated and used to represent the protein ratio between these two runs. A least-squares regression is then performed to approximate the relative abundance of the protein in each run in the dataset. This abundance is finally rescaled to the sum of the ion abundances across runs. A Student t-test (two-tailed t-test, equal variances) was then performed on log₂ transformed values to analyse differences in protein abundance in all biologic group comparisons. Significance level was set at $P \leq 0.05$, and ratios were considered relevant if higher than \pm 4. (The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PX...).

Whole cell and organelle (lysosome) lipidomics

The protocol was adapted from Li et al.⁹. For measurement of whole Myotube PIPsome a starting myoblast concentration of 10^6 in 10 cm culture dishes (in duplicate) was used. Lyso PIPsome, Lyso-IPs were performed from a starting myoblast concentration of 10^{10} in 15 cm culture dishes in duplicate. Myotube (9 days) pellets and Lyso-IP beads were washed twice with ice cold PBS with repeated centrifugation. Cell samples were snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C till use. PIPx Extraction. The desired samples were filled into homogenization tubes. Surrogate standards and internal standards were added prior to sample preparation. After adding 1.0 mL of prechilled CHCl₃/MeOH (1:2, v/v) and 0.15 g of zirconia/glass beads, the samples were homogenized (6800 rpm, 1 min at 4 °C, 10 \times 10 s, pause 30 s) with Precellys Evolution with Cryolys Evolution using dry ice cooling (Bertin Technologies, France). The samples were then spun down for 5 min (16,100 g at 4 °C). The supernatant was carefully removed. The residues were resuspended in 1365 μ L of prechilled MTBE/MeOH/2 N HCl (200:60:13, v/v/v). The samples were homogenized at 4 °C for another 1 min, and 250 μ L of 0.1 N HCl was added. The samples were vortexed at 4 °C for 5 min. After centrifugation (16,100 g, 5 min at 4 °C), the upper layer was transferred into fresh tubes and 500 μ L of 0.01 N HCl was added. The upper layer was collected for phosphate methylation after 30 s vortexing at 4 °C followed by centrifugation (16,100 g, 5 min at 4 °C). Phosphate Methylation. TMSD solution (50 μ L; 2 M) was added to the PIPx extract from above. The samples were allowed to stand for 10 min at room temperature after briefvortexing and fume release. The derivatization was quenched using 5 μ L of glacial acetic acid. Methylated PIs were washed twice with 500 μ L of MeOH/H₂O (1/1, v/v), including

vortexing and centrifugation (16,100 g, 5 min at 4 °C). The samples were dried under N₂ in an evaporator (Genevac EZ-2). After reconstitution with 50 µL of MeOH, facilitated by vortexing and sonication, the samples were submitted for LC-MS analysis. SWATH Acquisition with UHPLC-TripleTOF MS. Chromatographic separation was performed using a 1290 Infinity UHPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with a Daicel Chiralpak IB-U column (100 mm × 3.0 mm, 1.6 µm) and a KrudKatcher Ultra HPLC in-line filter (0.5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Mobile phases A and B were 10 mM ammonium formate in water and methanol, respectively. The gradient elution (0.0 min, 50% B; 5 min, 90% B; 10 min, 95% B; 10.1 min, 100% B; 12 min, 100% B; 12.1 min, 50% B; 15 min, 50% B) was carried out at a flow rate of 0.5 mL/min and a constant column temperature of 40 °C. Injection volume was 5 µL. MS detection was conducted with the above chromatographic system hyphenated to a TripleTOF 5600+ mass spectrometer with a DuoSpray source (Sciex, Framingham, MA, USA) operated with an ESI probe. Ion source parameters were as follows: curtain gas (N₂) 30 psi, nebulizer gas (zero grade air) 40 psi; heater gas (zero grade air) 50 psi, ion source voltage +3500 V (positive mode), and source temperature 500 °C. Sequential window acquisition of all theoretical fragment ion mass spectra (SWATH) experiments was performed to obtain comprehensive MS/MS data.

Data Processing was performed using Analyst 1.7 in both analytical systems for data acquisition and system control. Commercially available software packages PeakView (MasterView included) and MultiQuant (Sciex, Framingham, MA, USA) were involved in data processing. PeakView 2.2 was used for manual data evaluation and LC-MS performance check by comparing periodically with QC samples. MasterView 1.1 was used for identification. MultiQuant 3.0 was used for peak integration, linear regression, and concentration calculation.

Phosphoinositide pull-down and flotation assay

Recombinant proteins and phosphoinositide interaction was first addressed by lipid-protein pull-down assay. The phosphoinositide beads sample pack containing: control Beads, PI Beads, PI(3)P Beads, PI(4)P beads, PI(5)P Beads, PI(3,4)P2 Beads, PI(3,5)P2 Beads PI(4,5)P2 Beads and PI(3,4,5)P3 PIP Beads (Echelon Bioscience). Purified proteins of interest were diluted (2µg/ml final cc) in binding/wash buffer: 10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.25 % NP-40 supplemented with protease inhibitor cocktail. PI-beads were washed 4 times with binding/wash buffer at 4°C by gentil rotation for 5 min and centrifugation at 300xg for 5 min. A volume of 50µl of beads was added to protein solution and incubated for 2h at 4°C. After 5 time washing cycles bead-protein complexes were dissolved in 2XSDS buffer (Laemmli buffer) and binding proteins were revealed by immunoblotting.

For flotation assay CTRL liposomes were prepared as previously described (ref). Briefly, 200 µl of 1 mM liposome suspension composed of POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Avanti Polar Lipids) and POPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, Avanti Polar Lipids) at a molar ratio: 70:30. The phosphoinositides (PI) liposomes are composed by POPC:POPE:PI (molar ratio: 60:20:10). Lipid mixture in glass tubes were adjusted with 200 µl final volume of chloroform and homogenized for 10 minutes at 37 °C. The solvent was evaporated for 30 minutes under nitrogen to form a dry film followed by O/N incubation in vacuum chamber to eliminate traces of solvent. Dry Lipid mixture were resuspended in preheated (37 °C) PBS to obtain 1 mM lipid suspensions and then incubated for 1h in a 37 °C water bath with vigorous vortexing cycles every 10 min. Lipid mixture were subjected 5 cycles of freezing and thawing (in liquid nitrogen and 37 °C bath, respectively). Following centrifugation (1000xg for 5min at RT) liposomes were transferred to 1.5-mL microcentrifuge tubes and sonicated to obtain liposomes that can be stored at -80 until use. Before incubation with protein of interest, thawed liposomes were sonicated 60 minutes in a water bath sonicator filled with ice to obtain clear suspension. Liposomes diameters are around 50 nm (measured by dynamic light scattering). In a ultracentrifuge polycarbonate tubes, protein of interest (1µg) was mixed with 20 µL of each liposome (CTRL/POPC:POPE and POPC:POPE:PI liposomes) in a final volume of 100 µl PBS (w/o Ca/Mg). The protein-Liposome mixtures were incubated 20 min at RT and 100µl of 60% sucrose in PBS was added to yield a 30 % final sucrose concentration. The mixture was overlaid with 250 µl of 25 % sucrose and 50 µl of PBS (w/o Ca/Mg) on top. Centrifuge tubes at 200,000 xg for 1 h at 20 °C (TLA100 rotor,

Beckman). The liposomes-protein complex migrates to the top buffer layer. The Bottom (B), middle (M) and Top (T) fractions were collected with Hamilton syringe and submitted to Trichloroacetic acid (TCA) precipitation followed by analysis of the presence protein of interest by immunoblotting.

Mice experiments

The Mtm1-KO mouse line (genetic background 129/Sv) was generated previously (ref) and littermate wild type mice were used as controls. We used exclusively male mice (X-linked disease). Care and manipulation of mice was approved by ethical committees (Com'Eth (Ethical committee for animal experimentation, university of Strasbourg and centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et Ressources Expérimentales, university of Toulouse) according to national and European legislations on animal experimentation. A Group of 10 mice for each experimental protocol having the same age and similar weight were designed. And animals showing signs of suffering during treatment were discarded. A minimum of 8 mice/group were analyzed at the end of each experimental protocol. Animals were housed in a temperature-controlled room (19–22°C) with a 12:12-hours light/dark cycle. Blood Glucose, insulin and IGF1 was measured as previously described (ref Nassim). For mice treatment with AZD8055 treatment 2 weeks old mice were injected intraperitoneally with AZD8055 (AZ) (10mg/day/Kg) during 20 days. Pilot experiments on 3 Mtm1-KO mice/group showed that increasing AZD8055 concentration to 20mg/day/Kg did not improve much more muscle phenotype and mice lifespan. However, use of a concentration to 5mg/day/Kg decreases beneficial effects of mTORC1 inhibition. For toxin-induced muscle degeneration/regeneration and Adeno associated virus/AAV injection of MTM1 constructs, 10 µl of Notexin (Lotaxan Laboratory) at 25 µg/ml into the tibialis anterior/TA muscle after 7 days (the beginning of muscle regeneration phase), AAV1-MTM1-FL (CTRL) or AAV1-MTM1-C375S (inactive mutant) particles were injected in TA muscle as previously described (Ref). AAV particles were obtained from (ThermoFisher scientific) and used at 2×10^{10} viral genomes per ml (vg/ml). Mice are weighted daily and food intake are measured every day for all the groups. At the end of the experimental protocols, muscle force was measured on TA muscle otherwise mice were killed by CO₂ inhalation followed by cervical dislocation and Tibialis Anterior muscles (TA) were rapidly dissected. For protein expression analysis, part of the TA was homogenized with Dounce homogenizer in Lysis buffer (50mM Tris-Cl pH 8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA) supplemented with 1 % Triton X100, PMSF (1mM) and complete protease inhibitor tablet. Lysates were incubated in ice for 30 min and passed through a 25G syringe 10 times and then cleared by centrifugation at 14,000 g to obtain soluble fraction. The last part of TA muscle was conserved in nitrogen-cooled isopentane and liquid nitrogen for muscle transversal section and histology analysis as previously described ².

Histology, morphometry and muscle physiology

Transverse TA cryosections (10µm) were fixed and stained with H&E (Hematoxylin and eosin) or SDH activity ². Sections were imaged with a slide scanner NanoZoomer 2HT equipped with the fluorescence module L11600-21 (Hamamatsu Photonics). Fiber diameter and nuclei position were analyzed in H&E sections from TA mouse skeletal muscle, using FIJI image analysis software as previously described. For TEM (transmission electron microscopy) analysis, TA muscle minced in small pieces or organelle suspension were fixed in 2.5% glutaraldehyde with 0.1M sodium cacodylate buffer (PH 7.2) for 24 hr at 4°C, washed in 0.1M cacodylate buffer for 30 min and post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer for 1 hr at 4°C. Following stepwise dehydration with increasing concentrations of ethanol and embedding in Epon 812. Sections were observed with a Morgagni 268D electron microscope.

Muscle force was monitored in situ tibialis anterior (TA) muscle in response to sciatic nerve stimulation. Mice were anesthetized and were immobilized on a platform and hindlimbs were fixed with pins and clamps. The distal muscle tendon was attached to the servomotor system (Aurora Scientific). A surgical opening was performed to access to the sciatic nerve and be stimulated distally with a bipolar silver electrode using 0.1-ms-duration supramaximal square-wave pulses. The absolute maximal force generated during isometric contractions in response to electrical stimulation (500-ms-duration stimulation train, 100 Hz frequency). Absolute maximal force was determined at Lo (length at which

maximal tension was obtained during the tetanus). Absolute maximal force was normalized to muscle weight as an estimate of specific maximal force. After contractile measurements, mice were euthanized with an overdose of pentobarbital, and muscles were dissected and weighed.

Statistics and reproducibility

All the data were represented as the mean \pm S.E.M from at least three independent experiment (samples from cell culture) or at least biologically independent samples (tissues from mice). Note that no power calculation for sample size were used and no experiment were randomized. Sample size were determined based on previously published experiments in which significant difference were observed. Sample size and the number of repeats is indicated in figure legends. No data were excluded from the analysis except for Mtm1-KO mice who did not survive to end of the treatment. GraphPad Prism 9.4.0 was used for illustrations and statistic calculations. The comparison between means between two experimental groups was analyzed by Mann Whitney t-test. The difference between more than two experimental groups was analyzed by one-way, ANOVA with a post-hoc test (Šídák's multiple comparisons test). Statistical significance was considered when * $P < 0.05$ the exact P values are indicated in Source data for each figure.

Table1: List of primers used for cloning and mutagenesis

Constructs	Insert/mutagenesis	Primers (Forward/Fwd, Reverse/REV)
pLJC5-3xFlag-MTM1-KDEL	MTM1-KDEL (two step cloning)	FWD1 TTTGTTAGACGAAGCGCTAGCCATGGCGGCATGGACTACAAAGAC CATGACGGTGATTATAAAGATCATG, FWD2 CGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGAC AAGGCTTCTGCATCAACTTCTAAA, REV TTGTCTCGAGGTCGAGAATTCTTACAGTTCATCTTTGCCGCTCCCT CCGAAGTGAGTTTGCACATGGG
pLJC5-MOSPD2-MTM1-3xFLAG	MOSPD2-MTM1 (two step cloning)	FWD1 CGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGAC AAGGCTTCTGCATCAACTTCTAAA FWD2 TTTGTTAGACGAAGCGCTAGCCATGGCGGCATGGACTACAAAGAC CATGACGGTGATTATAAAGATCATG REV1 GCAAGAGCATTGTTAAGGAAAGCAGCAGCTGCTGGAACCAGCCGC TCCCTCCGAAGTGAGTTTGCACATGGG REV2 TTGTCTCGAGGTCGAGAATTCTTATAAATAGAAGAAAGAGGTGACA AAAGCAAGCAAGAGCATTGTTAAGGAA
pGEX4T1-ATG18-WD40	ATG18-WD40 repeats	FWD TGGATCCCCGGAATTCTGGTTCCGCGTGGATCTC REV AGTCACGATGCGGCCTCAATCCATCAAGATGGAATACTGT
pGEX4T1-Raptor-WD40	Raptor-WD40 repeats	FWD TGGATCCCCGGAATTCTTGGACGACCAAATATTTCTGAAC REV AGTCACGATGCGGCCGCTATCTGACACGCTTCTCCACCG
pGEX4T1-MCOLN1	MCOLN1	FWD TGGATCCCCGGAATTTCCGGAATCAGATCTCGAGCT REV AGTCACGATGCGGCCTTATCTAGATCCGGTGGATCCCAGC
pLJM1-Flag-RagA T21N	RagA-T21N	FWD GGGGAAGAACAGCATGAGGTCGATAATCTTCGC REV ATGCTGTTCTTCCCCGACCCGCTCT
pLJM1-Flag-RagAR37P	RagA-R37P	FWD CGACACCCCGCGCCTGGGGGCCACCAT

		REV AGGCGCGGGGTGTCGCGAGCAATGT
pLJM1-Flag- RagA Q66L	RagA-Q66L	FWD TGGCGGTCTGGACACCTTCATGGAAAATTACTTC REV GTGTCCAGACCGCCACAGTCCCACA
pRK5- LAMTOR1 K103A/K104 A	LAMTOR1- K103A/K104A	FWD ATTGGGCGGCGCTGCCACCGCTGCCGTCTC REV GCAGCGCCGCCCAATGGGTCAGGCTGCTGC
pRK5- LAMTOR3 K6A/R7A	LAMTOR3- K6A/R7A	FWD ACCTAGCGGCATTCTTGTATAAAAAGTTACCAAGTG REV AGAATGCCGCTAGGTCATCCGCCATTTAAG
pRK5- LAMTOR3 K34A	LAMTOR3-K34A	FWD TGTTATTGCAGTGGCAAATGACAATGCTCCA REV GCCACTGCAATAACAGGTACTIONCATCTCTATCT

Table2: List of antibodies used in this study and related information

Antibody/specie/catalog number/clone	Source	Used Dilution (WB or/and IF)	Validation
Anti-Puromycin Mouse monoclonal MABE343 Clone 12D10	SIGMA	WB 1:2000 IF: 1/1000	Validated by supplier with the following notes: (1) Specie reactivity all. (2) Demonstrated to react with Human test sample, preincubated with Puromycin. Predicted to react with all species when test sample is incubated with Puromycin.
Anti-Myotubularin /MTM1 Rabbit polyclonal	Home made	WB: 1:1000	Validated in ref (X xx) and this study.
Anti-β-Actin Mouse monoclonal A5441 Clone AC-15	SIGMA	WB 1/5000	Validated by supplier with the following notes: (1) Used as a loading control for western blot analysis of immunoprecipitated proteins from rat dorsal root ganglion cocultures. (2) Used as a loading control for WB of rat liver protein lysates.
Anti-p70S6K (E8K6T) XP® Rabbit mAb #34475	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier with the following notes: (1) recognizes endogenous levels of total p70 S6 kinase protein. This antibody does not cross-react with p70 S6 kinase-2. (2) Species Reactivity: Human, Mouse, Rat, Monkey
Anti-p70S6K (T398) Rabbit polyclonal #9205	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier with the following notes: (1) detects endogenous levels of p70 S6 kinase only when phosphorylated at threonine 389. (2) detects p85 S6 kinase when phosphorylated at the analogous site (Thr412), and possibly S6KII phosphorylated at Thr388.
Anti-α-Tubulin Mouse monoclonal T5168/Clone B-5-1-2	SIGMA	WB 1:5000	Validated by supplier with the following note: Recognizes an epitope located at the C-terminal end of the α-tubulin isoform in a variety of organisms.
Anti-4E-BP1 Rabbit mAb #96444/Clone 53H11	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier with the following notes: (1) Detects endogenous levels of total 4E-BP1 protein. (2) Species Reactivity: Human, Mouse, Rat, Monkey
Anti-Phospho-4E-BP1(Thr37/46) Rabbit mAb #2855 /Clone 236B4	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier with the following notes: (1) detects endogenous levels of 4E-BP1 only when phosphorylated at Thr37 and/or Thr46. (2) may cross-react with 4E-BP2 and 4E-BP3 when phosphorylated at equivalent sites.
Anti-Akt (pan) Rabbit mAb #4685/Clone 11E7	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier with the following note: detects endogenous levels of total Akt protein.

			This antibody does not cross-react with other related proteins.
Anti-Phospho-Akt (Ser473)XP® Rabbit mAb #4060/Clone D9E	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier with the following note: (1) detects endogenous levels of Akt1 only when phosphorylated at Ser473. This antibody also recognizes Akt2 and Akt3 when phosphorylated at the corresponding residues.
Anti-Tuberin/TSC2 Rabbit mAb #3990/Clone D57A9	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier with the following note: Tuberin/TSC2 (D57A9) Rabbit mAb detects endogenous levels of total tuberin protein.
Anti-Phospho-Tuberin/TSC2 (Thr1462) Rabbit mAb #3617/Clone 5B12	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier with the following note: detects endogenous levels of tuberin only when phosphorylated at threonine 1462.
Anti-S6 Ribosomal Protein Rabbit mAb #2217/Clone 5G10	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier with the following note: detects endogenous levels of total S6 ribosomal protein independent of phosphorylation.
Anti-Phospho-S6 (Ser240/244)XP® Rabbit mAb #5364/Clone D68F8	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier with the following note: detects endogenous levels of ribosomal protein S6 only when phosphorylated at Ser240 and Ser244.
Anti-LC3B Rabbit polyclonal #2775	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier with the following notes: Detects endogenous levels of total LC3B protein.
Anti-SQSTM1/p62 Rabbit mAb #39749 /Clone D1Q5S	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier with the following notes: Detects endogenous levels of total LC3B protein. recognizes endogenous levels of total SQSTM1/p62 protein in Human, Mouse, Rat lysates
Anti-mTOR Rabbit mAb #2983/clone 7C10	Cell Signaling	WB 1:1000 IF 1:500	Validated by supplier with the following note: detects endogenous levels of total mTOR protein in Human, Mouse, Rat, Monkey.
Anti-Raptor Rabbit mAb #2280/clone 24C12	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier with the following note: detects endogenous levels of total Raptor protein.
Anti-RagA Rabbit mAb #4357/clone D8B5	Cell Signaling	WB 1:1000 IF 1:200	Validated by supplier with the following note: detects endogenous levels of total RagA protein. Validated in this study for WB by the use of ShRNA.
RagC Rabbit mAb #9480/clone D8H5	Cell Signaling	WB 1:500	Validated by supplier with the following note: detects endogenous levels of total RagC protein.

Anti-LAMP-2 Mouse mAb sc-18822/clone H4B4	Santa Cruz	IF 1:500	Validated by supplier: detects endogenous levels of total LAMP2 in many cell types lysates by WB and in paraffin-embedded human kidney tumor. Validated in this study by co-localization with the Lyso-Tag 3XHA-TMEM192
Anti-CD63/LAMP3 Mouse mAb sc-59286/clone NK1/C3	Santa Cruz	IF 1:500	Validated by supplier: detects endogenous levels of total LAMP3 in many cell type lysates by WB and in paraffin-embedded tissues. Validated in this study by co-localization with the Lyso-Tag 3XHA-TMEM192
Anti-HA Mouse mAb H9658/ clone HA-7	SIGMA	WB 1:1000 IF 1:500	Validated by supplier with the following note: recognizes native as well as denatured-reduced forms of HA-tagged proteins. Validated in this study using the Lyso-Tag 3XHA-TMEM192 overexpression in C2C12 cells.
Anti-FLAG® M2 Mouse mAb F1804/clone M2	SIGMA	WB 1:2000	Validated by supplier with the following note: recognizes fusion proteins containing a FLAG peptide sequence. Validated in this study using Flag-RagA overexpression in C2C12 cells.
Anti-Myosin Heavy Chain/MHC Mouse mAb 14-6503-82/clone MF-20	Thermo Fisher Scientific	1:5000	Validated by the supplier and confirmed in this study using differentiation of C2C12 cell line.
Anti-HSP90 Rabbit mAb #4877/clone C45G5	Cell Signaling	WB 1:2000	Validated by supplier with the following note: detects endogenous levels of total HSP90 protein. This antibody does not cross-react with other HSPs.
Anti-LAMTOR1/C11orf59 XP® Rabbit mAb #8975/clone D11H6	Cell Signaling	WB 1:1000 IF 1:200	Validated by supplier using various cell extracts including C2C12 cell line. Validated in this study using ShRNA against <i>Lamtor1</i> in C2C12 cells.
Anti-LAMTOR2/ROBLD3 Rabbit mAb #8145/clone D7C10	Cell Signaling	WB 1:1000 IF 1:200	Validated by supplier using various cell extracts. Validated in this study by WB on C2C12 cell/lyso extracts and by IF detection using Lyso-Tag expressing C2C12 cells.
LAMTOR3/MAPKSP1 Rabbit mAb #8168/ clone D38G5	Cell Signaling	WB 1:1000 IF 1:200	Validated by supplier using various cell extracts. Validated in this study by WB on C2C12 cell/lyso extracts and by IF detection using Lyso-Tag expressing C2C12 cells.
LAMTOR4/C7orf59 Rabbit mAb	Cell Signaling	WB 1:1000 IF 1:200	Validated by supplier using various cell extracts. Validated in this study by WB on

#13140/clone D4P6O			C2C12 cell/lyso extracts and by IF detection using Lyso-Tag expressing C2C12 cells.
LAMTOR5/HBXIP Rabbit mAb #14633/clone D4V4S	Cell Signaling	WB 1:1000 IF 1:200	Validated by supplier using various cell extracts. Validated in this study by WB on C2C12 cell/lyso extracts and by IF detection using Lyso-Tag expressing C2C12 cells.
Anti-SLC38A9 Rabbit polyclonal HPA043785	SIGMA	WB 1:1000	Enhanced validation by supplier on various tissue section by immunocytochemistry. Validated in this study by WB using ShRNA mediated knockdown of Slc38A9 gene in C2C12 cells.
Anti-GOLGA2 (GM130) Rabbit polyclonal GTX54142	GeneTex	WB 1:1000	Validated by supplier by WB using various cell extracts. Validated in this study by WB on C2C12 cell extracts.
Anti-Calnexin C-term Rabbit polyclonal GTX109669	GeneTex	WB 1:2000	Validated by supplier by WB using various cell extracts. Validated in this study by WB on C2C12 cell extracts.
Anti-SERCA1 ATPase Mouse mAb #MA3-912/ Clone VE121G9	ThermoFisher	WB 1:1000	Validated by supplier by WB using rat skeletal muscle lysates. Validated in this study by WB on C2C12 cell extracts.
Anti-PEX3 Rabbit polyclonal GTX64847	GeneTex	WB 1:1000	Validated by supplier by WB using JurKat cell line and Rat Liver and brain. Validated in this study by WB on C2C12 cell extracts.
Anti-TOMM22 Rabbit polyclonal GTX134799	GeneTex	WB 1:1000	Validated by supplier by WB using various cell extracts. Validated in this study by WB on C2C12 cell extracts.
Anti-HSP70 Rabbit polyclonal #4872	Cell Signaling	WB 1:2000	Validated by supplier by WB using various cell extracts. Validated in this study by WB on C2C12 cell extracts.
Anti-Histone H3 XP® Rabbit mAb #4499/clone/D1H2	Cell Signaling	WB 1:5000	Validated by supplier by WB using various cell extracts. Validated in this study by WB on C2C12 cell extracts.
Anti-PtdIns(3,5)P2/PI(3,5)P2 Mouse monoclonal Z-P035	Echelon Bioscience	IF 1:250	Validated by supplier by immunofluorescence on cultured cells (not specified). Validated in this study using inhibition of PlkFye the enzyme that generate PI(3,5)P2.
Anti-GST Mouse monoclonal #sc-138/clone B-14	Santa Cruz	WB 1:5000	Validated by supplier by WB using recombinant GST and GST-tagged proteins.
Anti-PI3KC2b Mouse Monoclonal #AF7249	Biotechne/R&D system	WB 1:500	Validated by supplier by WB using HepG2 and U2OS cell lysates. Validated in this study using ShRNA mediated gene knockdown in C2C12 cells.

Anti-PI3 Kinase Class II α (PI3KC2a) Rabbit mAb #12402	Cell Signaling	WB 1:1000	Validated by supplier by WB using SW620 and HeLa cell lysates. Recognizes endogenous levels of total PI3K class II α protein. Validated in this study using C2C12 cell lysates.
Anti-Pikfyve Polyclonal Sheep #AF7885	Biotechnie/R&D system	WB 1:1000	Validated by supplier by WB using Jurkat and K62 cell lysates. Validated in this study using C2C12 cell lysates.

References

- 1 Falcone, S. *et al.* N-WASP is required for Amphiphysin-2/BIN1-dependent nuclear positioning and triad organization in skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy. *EMBO Mol Med* 6, 1455-1475, doi:10.15252/emmm.201404436 (2014).
- 2 Gavriilidis, C. *et al.* The MTM1-UBQLN2-HSP complex mediates degradation of misfolded intermediate filaments in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 20, 198-210, doi:10.1038/s41556-017-0024-9 (2018).
- 3 Goodman, C. A. & Hornberger, T. A. Measuring protein synthesis with SUNSET: a valid alternative to traditional techniques? *Exerc Sport Sci Rev* 41, 107-115, doi:10.1097/JES.0b013e3182798a95 (2013).
- 4 Shen, K., Choe, A. & Sabatini, D. M. Intersubunit Crosstalk in the Rag GTPase Heterodimer Enables mTORC1 to Respond Rapidly to Amino Acid Availability. *Mol Cell* 68, 821, doi:10.1016/j.molcel.2017.10.031 (2017).
- 5 de Araujo, M. E. G. *et al.* Crystal structure of the human lysosomal mTORC1 scaffold complex and its impact on signaling. *Science* 358, 377-381, doi:10.1126/science.aao1583 (2017).
- 6 Yonehara, R. *et al.* Structural basis for the assembly of the Regulator-Rag GTPase complex. *Nat Commun* 8, 1625, doi:10.1038/s41467-017-01762-3 (2017).
- 7 Abu-Remaileh, M. *et al.* Lysosomal metabolomics reveals V-ATPase- and mTOR-dependent regulation of amino acid efflux from lysosomes. *Science* 358, 807-813, doi:10.1126/science.aan6298 (2017).
- 8 Bouyssie, D. *et al.* Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* 36, 3148-3155, doi:10.1093/bioinformatics/btaa118 (2020).
- 9 Li, P. & Lammerhofer, M. Isomer Selective Comprehensive Lipidomics Analysis of Phosphoinositides in Biological Samples by Liquid Chromatography with Data Independent Acquisition Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem* 93, 9583-9592, doi:10.1021/acs.analchem.1c01751 (2021).

DISCUSSION

Le but de mon projet de thèse était d'identifier les effets moléculaires et physiologiques de l'accumulation des substrats de MTM1, les phosphoinositides PI3P et PI(3,5)P₂ connus comme s'accumulant dans les muscles déficients en MTM1. Notre étude démontre l'implication tant du PI3P que du PI(3,5)P₂ dans la régulation de la voie mTORC1, une voie de signalisation majeure dans le contrôle de la synthèse protéique en réponse aux facteurs environnementaux (nutriments, facteurs de croissance).

Dans un premier temps, en accord avec les données de la littérature (Fetalvero et al., 2013), nous avons montré que mTORC1 est suractivée dans un modèle Mtm1-KO. Également, et conformément au rôle connu de mTOR dans la synthèse protéique nous observons une augmentation de la synthèse protéique dans les myotubes XLCNM (myoblastes primaires issus de patients, ainsi que dans des cellules primaires murines) à partir de 6 jours de différenciation. Cette synthèse anormalement élevée de protéines est associée à un défaut de la différenciation des cellules. L'inhibition de la voie mTORC1 (inhibiteur pharmacologique AZD8055 200nM, quotidiennement de D5 à D9) diminue la synthèse protéique et restaure une différenciation musculaire normale. Nos résultats révèlent donc que la suractivation de mTORC1 et la surproduction protéique qui en résulte est contreproductive pour le processus de myogenèse.

Les études sur le rôle de mTORC1 dans la myogenèse ont démontré qu'il est un régulateur majeur de la myogenèse, et contrôle différentes étapes du processus de formation de la fibre musculaire. Ces études ainsi que nos résultats suggèrent une régulation fine de son activité au cours du processus de différenciation tant in vivo qu'ex vivo. Rion et al rapportent une activité plus forte de mTORC1 dans les myoblastes prolifératifs par rapport à ceux engagés dans la différenciation (en suivant la phosphorylation de la protéine S6 phosphorylée par S6K, effecteur de mTORC1) (Rion et al., 2019). En accord, les myoblastes de souris Raptor-KO présentent un défaut de prolifération (Rion et al., 2019) et des traitements courts à la rapamycine bloque la prolifération des myoblastes C2C12 (Conejo & Lorenzo, 2001). De manière contradictoire, ce même traitement n'affecte pas la prolifération des cellules satellites en réponse à une blessure induite par le froid chez la souris, pas plus qu'elle n'affecte leur survie (Miyabara et al., 2010). De façon intéressante, nous observons que les myoblastes C2C12 Mtm1-KO prolifèrent plus vite que les WT. D'après Dowling et al, 2010, cette augmentation de la prolifération serait due à la phosphorylation du facteur 4E-BP1 par mTOR, levant son activité inhibitrice sur la traduction (Dowling et al., 2010). Nous n'avons observé aucune modification de la phosphorylation de S6K dans nos modèles cellulaires, suggérant que la voie mTORC1

n'est pas impliquée dans le défaut de prolifération citée auparavant. De plus, on sait qu'au stade myoblastes, MTM1 a une expression très faible voir indétectable par les méthodes conventionnelles type western blot. Son expression augmente significativement dès le début de la différenciation. Lors d'une blessure, les cellules satellites quiescentes (Pax7+/myoD-) sont activées (Pax7+/myoD+), entrent dans une phase de prolifération pour accroître le pool de myoblastes (Pax7-, MyoD+) nécessaire à la réparation des fibres lésées. Un pic d'activité de mTORC1 est nécessaire pour passer du phénotype quiescent à activer. En accord, Rodger et al. décrivent que l'activité de mTOR régule le passage de l'état quiescent (G0) à un état « d'alerte » (G0alert) en réponse à un stress distant, conférant à la cellule satellite ainsi « alertée » une meilleure capacité à régénérer le muscle (Rodgers et al., 2014). A noter que, dans l'XLNM il y a un épuisement des cellules satellites à cause d'une apoptose (Lawlor et al., 2012). L'activité de mTORC1 est par contre requise pour les étapes de fusion et de maturation du muscle. Ainsi une invalidation conditionnelle de raptor dans les progéniteurs musculaires (myf5-Cre) ou les cellules souches (Pax-7-CRE) inhibe la formation des fibres musculaires et leur maturation, tant au cours de l'embryogenèse que de la myogenèse chez l'adulte (Rion et al., 2019).

Cependant, les étapes de fusion peuvent avoir lieu sans l'activité de mTORC1 puisque en effet, son inhibition par la rapamycine ou suite à la délétion de Raptor, n'abolit pas leur fusion même s'il y a une diminution de l'efficacité de celle-ci (Ge & Chen, 2012; Rion et al., 2019). Dans les étapes de croissance et de maturation (hypertrophie) mTORC1 est nécessaire, et son absence mène à une atrophie musculaire (Bentzinger et al., 2013; Rion et al., 2019).

Toutes ces données sont, pour la plupart, des observations indirectes de l'activité de mTORC1 (inactivation ou inhibition). Celles-ci proposent une augmentation de mTORC1 dans les phases de prolifération et une régulation cyclique au moment des phases de fusion et de maturation. Le modèle de cette régulation est présenté dans la figure suivante (**Figure 33**).

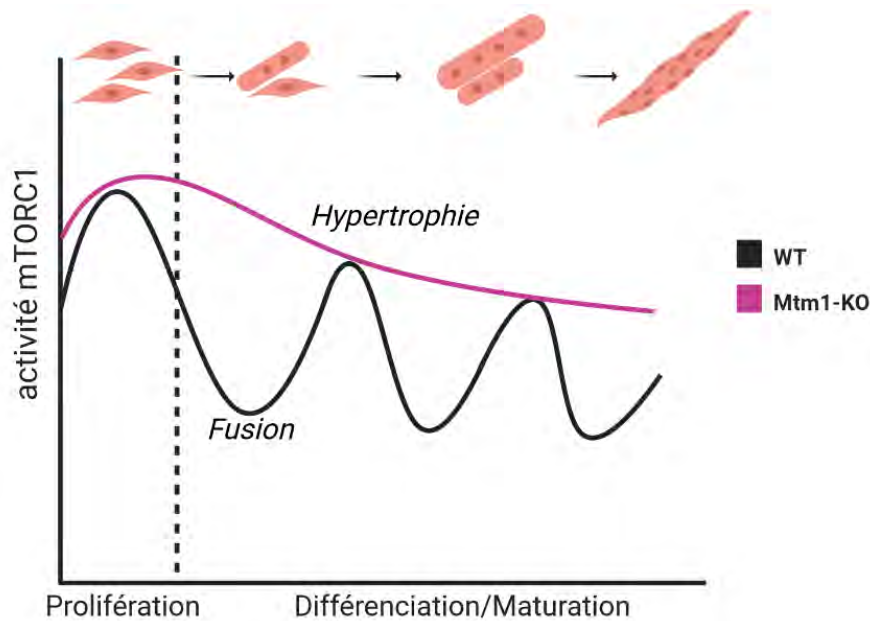


Figure 33 – Modèle théorique de l'activité de mTORC1 au cours de la différenciation musculaire.

Dans les modèles cellulaires de l'XLCNM murins et humain, une mauvaise régulation de la voie mTORC1 entraîne un défaut de l'hypertrophie menant à une atrophie ainsi qu'une augmentation du nombre de myotubes avec peu de noyaux (pré-myotubes ou des myotubes jeunes). Ainsi, on peut suggérer que les pré-myotubes formés ayant une activité de mTORC1 élevée deviennent imperméable ou résistants aux événements de fusion entre eux, une étape nécessaire pour augmenter la masse cellulaire et former des myotubes matures. Dès lors, dans notre modèle on aurait en majorité de pré-myotubes XLCNM qui sont le résultat de fusion de myoblastes entre eux. Cette hypothèse a une limite du fait que les souris Mtm1-KO naissent avec des muscles certes immatures mais relativement fonctionnelle, alors que les patients XLCNM sont beaucoup plus atteints que le modèle murin. Cette différence peut être expliquée du fait que la maturation musculaire chez le modèle murin se passe après la naissance (2-3 semaines) contrairement à l'Homme ayant lieu avant la naissance. Aussi, dans le modèle murin *in vivo*, il ne faudra pas écarter l'hypothèse qu'une compensation par d'autres myotubularines pendant le développement et la maturation musculaire de MTM1 pourrait aider le muscle à se former. *In fine*, la régulation de mTORC1 doit être finement régulée afin de préserver l'homéostasie cellulaire, et l'équilibre entre anabolisme (stimulé par mTOR), et catabolisme (inhibition de mTOR).

Comment l'activité de mTORC1, son association avec les lysosomes, et l'implication de PI3P et PI(3,5)P₂, se passe dans cette régulation méritaient d'être questionnés. Nos résultats suggèrent un rôle important de MTM1 dans cette régulation. Cette régulation par MTM1

permettrait de contrôler le niveau d'activation de mTORC1, et empêcherait sa suractivation néfaste pour la protéostase et l'homéostasie cellulaire. Alors que l'activité de mTORC1 est régulée par les facteurs environnementaux, la régulation de MTM1 reste un mystère, quels sont les signaux permettant son association aux lysosomes et comment elle est régulée seraient une question intéressante à résoudre. La seule donnée connue de nos jours est que son expression augmente aux cours de la myogenèse.

Afin d'étudier la régulation spatiotemporelle de mTORC1 au cours de la différenciation musculaire, mon laboratoire met actuellement en place un système publié par Zhou et ses collaborateurs en 2015. Il s'agit d'une sonde FRET ayant pour substrat de phosphorylation la protéine 4EBP1 (un effecteur de mTORC1) qui permet de suivre l'activité de mTORC1 dans des cellules vivantes (Zhou et al., 2015). Ce système nous permettrait d'évaluer la spatiotemporalité de mTORC1 durant la myogenèse et d'observer les liens entre la régulation de MTM1 et de mTORC1 depuis le stade des myoblastes, lors de leur fusion en myotubes, et plus tardivement lors de leur croissance/maturation.

De façon intéressante, nous n'avons trouvé aucune suractivation de la voie Akt/TSC dans les myotubes C2C12 MTM1-KO, menant à l'activation de mTORC1 suite à une stimulation par les facteurs de croissance. Cependant, lorsque l'on s'intéresse à l'activation de mTORC1 par les acides aminés on observe une augmentation du recrutement des complexes protéiques agissant dans cette voie tels que le complexe RAGULATOR (LAMTOR 1 à 5) et les petites Rag-GTPase sur les lysosomes. La recherche du lien entre les substrats de MTM1 et les RagGTPases nous a mené à trouver une interaction entre les protéines LAMTOR et les PI constituants de la membrane lysosomale. En effet, il a été montré une augmentation du PI3P dans un modèle de souris Mtm1-KO (Sabha et al., 2016). En accord avec ceci, nos résultats montrent une augmentation du PI3P et du PI(3,5)P₂ cellulaires et surtout une augmentation de ces espèces sur le lysosome.

Le modèle cristallographique (electrostatic surface potentiel map) de Ragulator nous a permis d'identifier des zones de contact potentielles entre les phosphoinositides et le complexe RAGULATOR. Ces zones contiennent des acides aminés chargés positivement pouvant interagir avec les charges négatives des phosphoinositides. Les différentes techniques utilisées (liposome flotation assay, ...) nous ont permis d'identifier le lien entre les substrats de MTM1 et le complexe RAGULATOR. Le PI3P se lie à LAMTOR 1 et le PI(3,5)P₂ à LAMTOR 3. La mutation de ces acides aminés (pour LAMTOR 1 les lysines 103 et 104, et pour LAMTOR 3

les lysines en position 6 et 34 ainsi que l'arginine en position 7) diminue fortement leur liaison respective avec les PIs, confirmant ainsi nos premiers résultats. Une telle liaison électrostatique entre un phosphoinositide et un membre de la signalisation de mTORC1 a été identifié récemment. En effet, Fitzian et collaborateurs en 2021 (Fitzian et al., 2021) identifient que le PI(3,5)P₂ ainsi que d'autre PIP₂ lient TSC1 par les mêmes techniques que nous avons utilisés dans cette étude. Dans notre modèle, cependant, la voie AKT ne semble pas impliquée dans la régulation de mTORC1, suggérant que le contrôle de TSC1 par le PI(3,5)P₂ pourrait être dépendante de Akt et/ou être tissu spécifique. Cette étude montre qu'en condition de privation nutritionnelle le PI(3,5)P₂ en particulier est capable de recruter TSC1 au lysosome qui a son tour recrute TSC2 qui finalement inhibe mTORC1. Nous pouvons discuter plusieurs points ici. L'étude montre l'importance de la dimérisation de TSC1 afin d'amplifier cette liaison au PIP₂. Dans notre étude, la liaison du complexe Ragulator au PI3P et PI(3,5)P₂ pourrait montrer une augmentation encore plus forte de la liaison et serait une expérience intéressante, bien que complexe, à réaliser.

Cependant le point le plus important reste ce rôle bivalent du PI(3,5)P₂ dans la régulation de mTORC1. Mon hypothèse ici étant qu'en condition environnementale optimum (les facteurs de croissance et les nutriments sont présents) le PI3P et le PI(3,5)P₂ jouent un rôle d'ancrage et de stabilisation du complexe mTORC1 via le complexe Ragulator-RagGTPase permettant la croissance cellulaire. Cependant en condition de starvation, il faut inhiber mTORC1 afin de refaire les stocks en nutriment. Le PI(3,5)P₂ lie alors TSC1 menant à freiner son activité. En condition de disponibilité de nutriment, TSC1 serait alors non dimérisé ou en complexe avec d'autre protéine et donc indisponible pour le PI(3,5)P₂ laissant le champs libre pour Ragulator. Une fois les stocks épuisés TSC1 se dimérise et augmentant ainsi son affinité avec le PI(3,5)P₂ rentre en compétition avec Ragulator menant au final à une meilleur liaison et à l'inhibition de mTORC1. Pour confirmer mon hypothèse, il manque cependant une étude biochimique, qui permettrait de définir l'affinité de chacun des complexes (TSC1 versus LAMTOR) pour PI(3,5)P₂, et ainsi montrer qu'ils peuvent rentrer en compétition pour la liaison au même phosphoinositide.

Dans notre étude, nous nous sommes aussi demandés comment étaient produit le PI3P et le PI(3,5)P₂ présents sur le lysosome. Les deux enzymes connus comme impliqués dans leur métabolisme sont PIKFyve permettant la conversion du PI3P en PI(3,5)P₂ et la PI3K-C2β permettant la conversion du PI en PI3P et du PI4P en PI(3,4)P₂. Les données actuelles sur la localisation de ces enzymes permettent de situer PIKFyve sur le système endosomal, elle est

localisée à différents degrés entre les endosomes précoces, les endosomes tardifs et même les MVB (Cabezas et al., 2006; Rohn et al., 2000; Shisheva, 2008). De nos jours, à cause d'anticorps non spécifiques en immunofluorescence, seule l'équipe de V. Haucke a localisé la PI3KC2 β grâce à un étiquetage GFP de la protéine endogène. Elle semble être localisée sur le lysosome (Marat et al., 2017; Wallroth et al., 2019). Ainsi, nos analyses de protéomique du lysosome montrent l'existence de PIKFYve et de la PI3KC2 β (à faible quantité). Dans notre étude, l'inhibition pharmacologique de PIKFyve a montré un effet négatif sur la différenciation des cellules musculaires contrôles, mais produit un effet bénéfique minime sur les cellules Mtm1-KO. Cet effet pourrait résulter en premier lieu d'une accumulation du PI3P dans la cellule, puisque le PI3P n'est plus converti en PI(3,5)P₂. De plus, le PI5P a été décrit comme un régulateur positif de la différenciation (Poli et al., 2019; Stijf-Bultsma et al., 2015). L'inhibition de PIKFyve entraîne très probablement une diminution du niveau de PI5P, pouvant expliquer la diminution du processus de différenciation observée. Au contraire, l'inhibition de la PI3KC2 β a montré un sauvetage de la différenciation des cellules MTM1-KO. En cohérence avec ces résultats, il est observé dans un modèle murin Mtm1-KO une restauration du phénotype musculaire lorsque l'expression PI3KC2 β est diminuée avec un shPI3KC2b (Sabha et al., 2016). Il est donc possible que la PI3KC2 β soit responsable de la formation d'un pool initiateur de PI3P au niveau de la membrane du lysosome, qui est à son tour métabolisé (en partie) par PIKFyve en PI(3,5)P₂. Ces deux PI serviraient ensuite d'ancrage au complexe Ragulator. Mon hypothèse est que l'inhibition de la PI3KC2 β entraîne donc une diminution de ces espèces et au final de l'activité de mTORC1 et la restauration de la différenciation des cellules.

Cependant dans une étude qui semble contradictoire avec nos résultats, l'équipe de V. Haucke montre qu'en condition de starvation la PI3KC2 β produit du PI(3,4)P₂ qui a un effet négatif sur l'activation de mTORC1 (Marat et al., 2017). Les différences peuvent être dû au contexte cellulaire. Cette étude se place dans des cellules HEK prolifératives en absence de facteurs de croissance. Dans un tel contexte peut-être la PI3KC2 β produirait du PI(3,4)P₂ afin d'inhiber mTORC1. Cela reste cependant un point important à éclaircir afin d'envisager l'utilisation d'inhibiteurs de la PI3KC2 β dans le traitement des myopathies XLCNM. Néanmoins, il n'existe à ce jour aucun inhibiteur spécifique de cette enzyme.

Un dernier point à éclaircir est la localisation de MTM1. En effet, il n'existe pas d'anticorps qui fonctionnent correctement en immunofluorescence dans notre modèle de cellule. Actuellement, dans mon laboratoire une méthode constituant à étiqueter Mtm1 endogène avec un « tag » V5 est en cours de réalisation. En attendant, les premiers résultats de cette expérience

nous avons adressé artificiellement MTM1 aux lysosomes dans des cellules *Mtm1*-KO et cela semble restaurer partiellement le phénotype des cellules *Mtm1*-KO. L'adressage aux lysosomes du *Mtm1*-CS ne montre aucune restauration du phénotype, validant une action phosphatase de MTM1 sur le lysosome. Cependant, dans la littérature, la localisation la plus probable de MTM1 reste le RE/RS (Amoasii et al., 2012; Buj-Bello et al., 2008; Hnia et al., 2011). Confirmant cette localisation, une approche protéomique par BioID réalisée dans l'équipe (et résultats non publiés de l'équipe) a révélé plusieurs données intéressantes. MTM1 s'associe à différents partenaires au sein de la cellule musculaire. Dans les myotubes sont retrouvés des partenaires connus comme jouant un rôle dans la réponse calcique à l'influx nerveux tels que STIM1 et STIM2 (*stromal interaction molecule*, des senseurs du calcium sur le réticulum sarcoplasmique); synaptotagmin-1 et 2 (des senseurs du calcium). Nous retrouvons aussi des protéines utiles à la structure des tubules T, tel que *Jph2* (*Junctophilin-2*), une protéine membranaire qui fait un pont structurel entre la membrane plasmique et le réticulum sarcoplasmique, importante pour le couplage excitation-contraction). Ces trois protéines (données préliminaires de l'équipe non publiées) sont localisées dans le réticulum sarcoplasmique ou à proximité de celui-ci.

Une autre étude de BioID réalisé par Volpatti et al, en 2022 dans des C2C12 différenciées pendant 3 jours, montrent des partenaires tels que des protéines participant au trafic des intégrines (ITGB1 : $\beta 1$ -*integrine*) (Volpatti et al., 2022). Cette étude trouve aussi d'autres protéines appartenant au adhésions focale, nous pouvons ici émettre l'hypothèse que différents pools de MTM1 peuvent avoir différentes fonctions. Ainsi, MTM1 aux adhésions focaux aurait une fonction sur les intégrines et l'adhésions entre cellules ou à la matrice extracellulaire. A noté que cette étude révèle aussi SH3BP4 comme un partenaire de MTM1. Cette protéine a notamment été étudié comme étant un régulateur négatif de mTORC1 via les Rag-GTPase (Kim et al., 2012).

D'un autre côté MTM1 au niveau du RE/RS aurait un autre rôle, celui d'être un régulateur négatif de mTORC1. Pour cela, les sites de contacts membranaire (MSC) entre le RE/RS et le lysosome seraient essentiel au rôle de MTM1 vis-à-vis des PI présent sur le lysosome et pour la modulation du signal mTORC1. Dans la cellule musculaire, le RE/RS joue un rôle essentiel lors de la contraction musculaire en libérant et en recaptant le calcium qu'il contient. Dans notre étude, nous observons que la perte de fonction de *Mtm1* est liée à une diminution de ces contacts (observés par PLA), des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle de MTM1 dans le maintien/formation de ces contacts. Dans le muscle,

ces contacts RS et lysosome semblent très importants, en effet dans une étude de 2014, dans un modèle musculaires lisse artérielles, ces contacts permettent une bonne distribution du calcium et donc ont un rôle important dans la fonction musculaire (Kinneer et al., 2004).

Une hypothèse serait alors que ces contacts via MTM1 et ses partenaires pourrait dans des cellules différenciées, lié la fonction calcique (RS, STIM1/2, synpatotagmin1/2) et d'une certaine manière l'activité de mTORC1 ? (Figure 34)

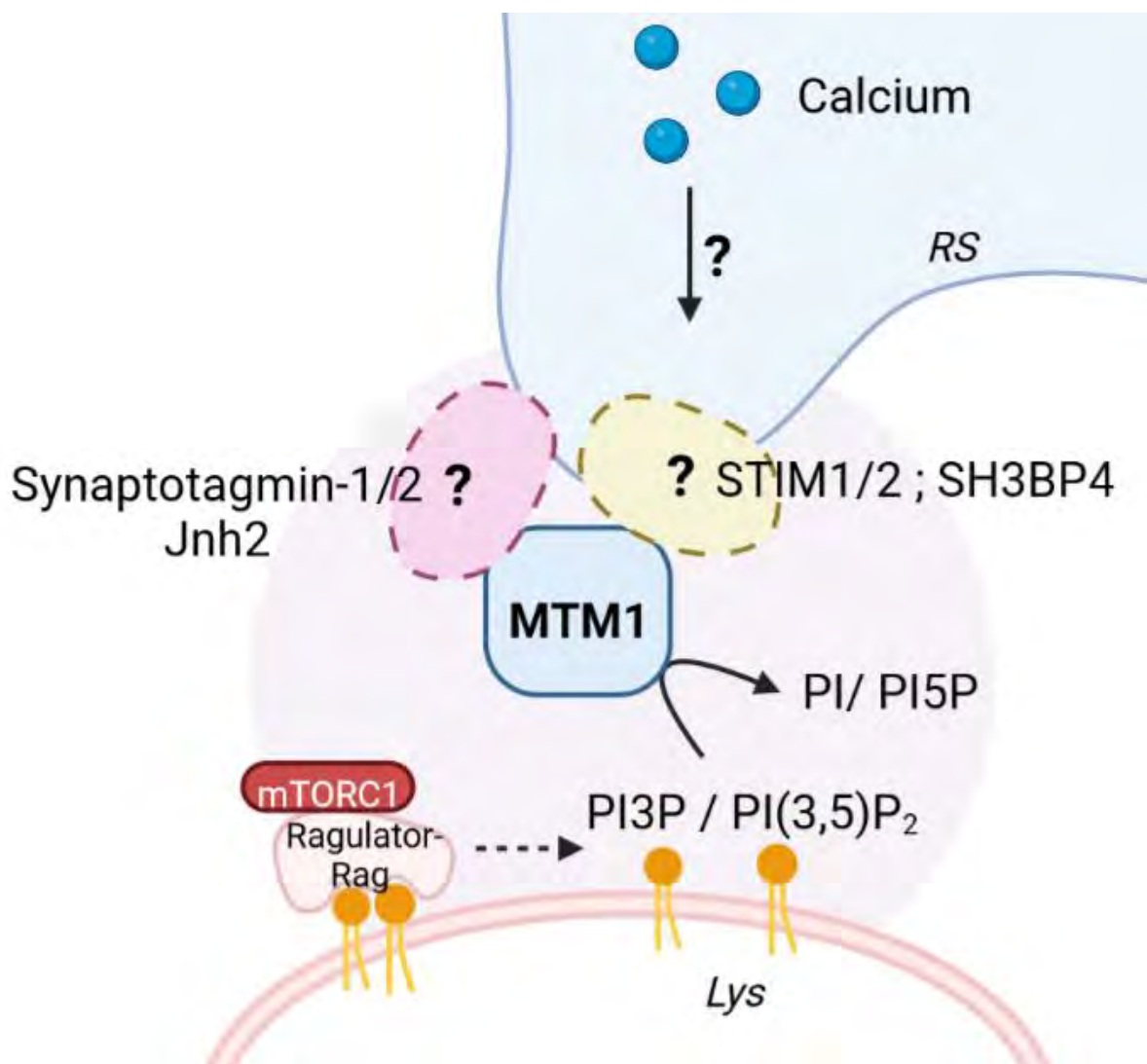


Figure 34 – Modèle hypothétique de la fonction de MTM1 au niveau du RE/RS.

Cependant, le rôle de MTM1 dans cette pathologie ne peut être expliqué uniquement par sa localisation sur le réticulum sarcoplasmique. Il est fort possible que d'autres pools cellulaires de MTM1 aient des rôles spécifiques en fonction des étapes de la myogenèse mais aussi le statut nutritionnel.

Une étude de Hnia et al (Hnia et al., 2011) montre l'interaction avec des filaments structurels comme la desmine, important pour la structure et l'intégrité des sarcomères de la

cellule musculaire et donc sa fonction de contraction. L'étude montre une accumulation de desmine mal conformée. La cellule musculaire est une cellule avec une très longue durée de vie, d'où l'importance de systèmes de dégradation opérationnels. Le recyclage des composants usés est essentiel pour éviter une accumulation, et cette publication met en avant les défauts de l'UPS (ubiquitin proteasome system) suite à l'absence de MTM1 dans les myotubes mais aussi dans le muscle adulte. Il serait donc intéressant de continuer à trouver des partenaires moléculaires de MTM1 dans des conditions de stress protéotoxique (inhibition de l'UPS ou de l'autophagie) et déterminer le rôle potentiel de MTM1 dans l'oscillation entre la voie de l'anabolisme (mTORC1) et ces voies du catabolisme.

En effet, l'autophagie est sous contrôle direct de mTORC1. Il est ainsi légitime de questionner quelle est l'impact de la dérégulation de mTORC1 sur le processus de l'autophagie dans les modèles XLCNM. Fetalvero et collaborateurs sont les premiers à rapporter un défaut de la voie mTOR mais également de l'autophagie dans un modèle murin *Mtm1*-KO élaboré par la stratégie du GeneTRAP. Ils observent une accumulation de p62 et de LC3-II dans les fibres musculaires de ces souris, suggérant un blocage tardif de l'autophagie, au niveau de la fusion de l'autophagosome au lysosome. Des mitochondries défectueuses s'accumulent également dans les muscles. En adéquation avec nos résultats, ils rapportent une suractivation de mTOR dans les muscles *MTM1*-KO. L'inhibition pharmacologique de mTOR (RAD001 ou AZD8055) restaure l'autophagie et corrige les défauts musculaires démontrant un lien direct entre la dérégulation de mTOR et les défauts d'autophagie. Mon laboratoire a entamé un projet sur les effets de ce blocage de l'autophagie dans notre modèle et notamment l'accumulation d'organelle défectueux tel que les mitochondries. Quant au lien mTORC1 et UPS, peu de choses sont connues à ce jour. Cependant, il a été montré que l'ubiquitine ligase FBXW7 contrôlerait l'ubiquitinylation et la dégradation de mTOR. Il serait intéressant d'explorer le turnover de mTOR dans nos modèles de XLCNM (projet en cours dans le laboratoire).

Enfin, nous avons au cours de ce travail questionné la pertinence physiopathologique de la suractivation de mTORC1 dans le modèle murin *Mtm1*-KO et observé les bénéfices d'un traitement avec un inhibiteur de mTORC1 (AZD8055). Le traitement à une dose quotidienne de 10mg/kg/jour pendant 20 jours (IP) induit un gain en poids et en masse musculaire des souris. Ce traitement prolonge la durée de vie des souris *Mtm1*-KO jusqu'à une moyenne de 100 jours doublant ainsi leur espérance de vie. Ces effets sont accompagnés par une amélioration du phénotype musculaire (taille des fibres et % de noyaux internalisés) mais aussi de la contraction musculaire (force spécifique) mesurée ex-vivo (Tibialis antérieurs). Il semble donc possible d'envisager un traitement thérapeutique, à tester sur un autre modèle animal plus

gros comme par exemple le modèle canin qui possède des individus avec une mutation naturelle dans *Mtm1*, pour ensuite envisager un essai clinique sur l'homme. Le plus avantageux dans cette thérapie pharmaceutique est que les analogues de la rapamycine tels que l'AZD8055 sont des molécules déjà approuvées par la FDA (Food and Drug Administration). Ainsi, notre travail permet de montrer l'importance des substrats de MTM1 dans l'activation de mTORC1 via la voie un effet direct sur le complexe RagGTPase. Mon travail permet de mettre en évidence un nouveau mécanisme d'action des phosphoinositides sur la voie mTORC1 et les retombées physiopathologiques dans XLCNM. A l'heure actuelle, des essais cliniques reposant sur la restauration de l'expression de MTM1 dans les muscles des enfants myopathes ont été réalisés, et reposent sur l'utilisation de virus AAV. Ces essais ont dû être stoppés, à cause des effets adverses de ces virus sur le foie, qui ont conduit au décès de plusieurs enfants traités. Nous proposons donc mTORC1 comme une nouvelle cible thérapeutique pour XLCNM.

BIBLIOGRAPHIE

Aits, S., & Jäättelä, M. (2013). Lysosomal cell death at a glance. *Journal of Cell Science*, 126(9), 1905-1912. <https://doi.org/10.1242/jcs.091181>

Alexander, A., Cai, S.-L., Kim, J., Nanez, A., Sahin, M., MacLean, K. H., Inoki, K., Guan, K.-L., Shen, J., Person, M. D., Kusewitt, D., Mills, G. B., Kastan, M. B., & Walker, C. L. (2010). ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), 4153-4158. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913860107>

Alpy, F., Rousseau, A., Schwab, Y., Legueux, F., Stoll, I., Wendling, C., Spiegelhalter, C., Kessler, P., Mathelin, C., Rio, M.-C., Levine, T. P., & Tomasetto, C. (2013). STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *Journal of Cell Science*, 126(23), 5500-5512. <https://doi.org/10.1242/jcs.139295>

Alpy, F., Stoeckel, M.-E., Dierich, A., Escola, J.-M., Wendling, C., Chenard, M.-P., Vanier, M. T., Gruenberg, J., Tomasetto, C., & Rio, M.-C. (2001). The Steroidogenic Acute Regulatory Protein Homolog MLN64, a Late Endosomal Cholesterol-binding Protein *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4261-4269. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006279200>

Al-Qusairi, L., Prokic, I., Amoasii, L., Kretz, C., Messaddeq, N., Mandel, J.-L., & Laporte, J. (2013). Lack of myotubularin (MTM1) leads to muscle hypotrophy through unbalanced regulation of the autophagy and ubiquitin-proteasome pathways. *The FASEB Journal*, 27(8), 3384-3394. <https://doi.org/10.1096/fj.12-220947>

Ambler, M. W., Neave, C., & Singer, D. B. (1984). X-linked recessive myotubular myopathy : II. Muscle morphology and human myogenesis. *Human Pathology*, 15(12), 1107-1120. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(84\)80305-6](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(84)80305-6)

Ambler, M. W., Neave, C., Tutschka, B. G., Pueschel, S. M., Orson, J. M., & Singer, D. B. (1984). X-linked recessive myotubular myopathy : I. Clinical and pathologic findings in a family. *Human Pathology*, 15(6), 566-574. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(84\)80011-8](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(84)80011-8)

Amoasii, L., Bertazzi, D. L., Tronchère, H., Hnia, K., Chicanne, G., Rinaldi, B., Cowling, B. S., Ferry, A., Klaholz, B., Payrastre, B., Laporte, J., & Friant, S. (2012). Phosphatase-Dead Myotubularin Ameliorates X-Linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice. *PLOS Genetics*, 8(10), e1002965. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002965>

Amoasii, L., Hnia, K., Chicanne, G., Brech, A., Cowling, B. S., Müller, M. M., Schwab, Y., Koebel, P., Ferry, A., Payrastre, B., & Laporte, J. (2013). Myotubularin and PtdIns3P

remodel the sarcoplasmic reticulum in muscle in vivo. *Journal of Cell Science*, 126(8), 1806-1819. <https://doi.org/10.1242/jcs.118505>

Anandapadamanaban, M., Masson, G. R., Perisic, O., Berndt, A., Kaufman, J., Johnson, C. M., Santhanam, B., Rogala, K. B., Sabatini, D. M., & Williams, R. L. (2019). Architecture of human Rag GTPase heterodimers and their complex with mTORC1. *Science*, 366(6462), 203-210. <https://doi.org/10.1126/science.aax3939>

Appenzeller-Herzog, C., & Hall, M. N. (2012). Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Trends in Cell Biology*, 22(5), 274-282. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.02.006>

Aylett, C. H. S., Sauer, E., Imseng, S., Boehringer, D., Hall, M. N., Ban, N., & Maier, T. (2016). Architecture of human mTOR complex 1. *Science*, 351(6268), 48-52. <https://doi.org/10.1126/science.aaa3870>

Ballabio, A., & Bonifacino, J. S. (2020). Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(2), 101-118. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0185-4>

Bar-Peled, L., Schweitzer, L. D., Zoncu, R., & Sabatini, D. M. (2012). Ragulator Is a GEF for the Rag GTPases that Signal Amino Acid Levels to mTORC1. *Cell*, 150(6), 1196-1208. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.032>

Beggs, A. H., Byrne, B. J., De Chastonay, S., Haselkorn, T., Hughes, I., James, E. S., Kuntz, N. L., Simon, J., Swanson, L. C., Yang, M. L., Yu, Z.-F., Yum, S. W., & Prasad, S. (2018). A multicenter, retrospective medical record review of X-linked myotubular myopathy : The recensu study. *Muscle & Nerve*, 57(4), 550-560. <https://doi.org/10.1002/mus.26018>

Begley, M. J., Taylor, G. S., Brock, M. A., Ghosh, P., Woods, V. L., & Dixon, J. E. (2006). Molecular basis for substrate recognition by MTMR2, a myotubularin family phosphoinositide phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 927-932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510006103>

Begley, M. J., Taylor, G. S., Kim, S.-A., Veine, D. M., Dixon, J. E., & Stuckey, J. A. (2003). Crystal Structure of a Phosphoinositide Phosphatase, MTMR2 : Insights into Myotubular Myopathy and Charcot-Marie-Tooth Syndrome. *Molecular Cell*, 12(6), 1391-1402. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00486-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00486-6)

Blondeau, F., Laporte, J., Bodin, S., Superti-Furga, G., Payrastre, B., & Mandel, J.-L. (2000). Myotubularin, a phosphatase deficient in myotubular myopathy, acts on phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 3-phosphate pathway. *Human Molecular Genetics*, 9(15), 2223-2229. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.hmg.a018913>

Boucrot, E., Ferreira, A. P. A., Almeida-Souza, L., Debard, S., Vallis, Y., Howard, G., Bertot, L., Sauvonnet, N., & McMahon, H. T. (2015). Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature*, *517*(7535), Art. 7535. <https://doi.org/10.1038/nature14067>

Bridges, D., Ma, J.-T., Park, S., Inoki, K., Weisman, L. S., & Saltiel, A. R. (2012). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate plays a role in the activation and subcellular localization of mechanistic target of rapamycin 1. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(15), 2955-2962. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-12-1034>

Brown, E. J., Albers, M. W., Bum Shin, T., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, *369*(6483), 756-758. <https://doi.org/10.1038/369756a0>

Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., Witters, L. A., Ellisen, L. W., & Kaelin, W. G. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & Development*, *18*(23), 2893-2904. <https://doi.org/10.1101/gad.1256804>

Buj-Bello, A., Fougousse, F., Schwab, Y., Messaddeq, N., Spehner, D., Pierson, C. R., Durand, M., Kretz, C., Danos, O., Douar, A.-M., Beggs, A. H., Schultz, P., Montus, M., Denèfle, P., & Mandel, J.-L. (2008). AAV-mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis. *Human Molecular Genetics*, *17*(14), 2132-2143. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn112>

Buj-Bello, A., Laugel, V., Messaddeq, N., Zahreddine, H., Laporte, J., Pellissier, J.-F., & Mandel, J.-L. (2002). The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(23), 15060-15065. <https://doi.org/10.1073/pnas.212498399>

Cabezas, A., Pattni, K., & Stenmark, H. (2006). Cloning and subcellular localization of a human phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase, PIKfyve/Fab1. *Gene*, *371*(1), 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.11.009>

Campa, C. C., Margaria, J. P., Derle, A., Del Giudice, M., De Santis, M. C., Gozzelino, L., Copperi, F., Bosia, C., & Hirsch, E. (2018). Rab11 activity and PtdIns(3)P turnover removes recycling cargo from endosomes. *Nature Chemical Biology*, *14*(8), 801-810. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0086-4>

Cao, C., Laporte, J., Backer, J. M., Wandinger-Ness, A., & Stein, M.-P. (2007). Myotubularin Lipid Phosphatase Binds the hVPS15/hVPS34 Lipid Kinase Complex on Endosomes. *Traffic*, 8(8), 1052-1067. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00586.x>

Cao, Q., Zhong, X. Z., Zou, Y., Zhang, Z., Toro, L., & Dong, X.-P. (2015). BK Channels Alleviate Lysosomal Storage Diseases by Providing Positive Feedback Regulation of Lysosomal Ca²⁺ Release. *Developmental Cell*, 33(4), 427-441. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.04.010>

Chantranupong, L., Scaria, S. M., Saxton, R. A., Gygi, M. P., Shen, K., Wyant, G. A., Wang, T., Harper, J. W., Gygi, S. P., & Sabatini, D. M. (2016). The CASTOR Proteins Are Arginine Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell*, 165(1), 153-164. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.035>

Chen, X., Liu, M., Tian, Y., Li, J., Qi, Y., Zhao, D., Wu, Z., Huang, M., Wong, C. C. L., Wang, H.-W., Wang, J., Yang, H., & Xu, Y. (2018). Cryo-EM structure of human mTOR complex 2. *Cell Research*, 28(5), Art. 5. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0029-3>

Childers, M. K., Joubert, R., Poulard, K., Moal, C., Grange, R. W., Doering, J. A., Lawlor, M. W., Rider, B. E., Jamet, T., Danièle, N., Martin, S., Rivière, C., Soker, T., Hammer, C., Wittenberghe, L. V., Lockard, M., Guan, X., Goddard, M., Mitchell, E., ... Buj-Bello, A. (2014). Gene Therapy Prolongs Survival and Restores Function in Murine and Canine Models of Myotubular Myopathy. *Science Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007523>

Cowling, B. S., Chevremont, T., Prokic, I., Kretz, C., Ferry, A., Coirault, C., Koutsopoulos, O., Laugel, V., Romero, N. B., & Laporte, J. (2014). Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(3), 1350-1363. <https://doi.org/10.1172/JCI71206>

Danièle, N., Moal, C., Julien, L., Marinello, M., Jamet, T., Martin, S., Vignaud, A., Lawlor, M. W., & Buj-Bello, A. (2018). Intravenous Administration of a MTMR2-Encoding AAV Vector Ameliorates the Phenotype of Myotubular Myopathy in Mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 77(4), 282-295. <https://doi.org/10.1093/jnen/nly002>

De Craene, J.-O., Bertazzi, D. L., Bär, S., & Friant, S. (2017). Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/ijms18030634>

de Lartigue, J., Polson, H., Feldman, M., Shokat, K., Tooze, S. A., Urbé, S., & Clague, M. J. (2009). PIKfyve Regulation of Endosome-Linked Pathways. *Traffic*, *10*(7), 883-893. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00915.x>

Demetriades, C., Doumpas, N., & Teleman, A. A. (2014). Regulation of TORC1 in Response to Amino Acid Starvation via Lysosomal Recruitment of TSC2. *Cell*, *156*(4), 786-799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.024>

Di Mattia, T., Martinet, A., Ikhlef, S., McEwen, A. G., Nominé, Y., Wendling, C., Poussin-Courmontagne, P., Voilquin, L., Eberling, P., Ruffenach, F., Cavarelli, J., Slee, J., Levine, T. P., Drin, G., Tomasetto, C., & Alpy, F. (2020). FFAT motif phosphorylation controls formation and lipid transfer function of inter-organelle contacts. *The EMBO Journal*, *39*(23), e104369. <https://doi.org/10.15252/emboj.2019104369>

Dibble, C. C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J. M., Finan, P. M., Kwiatkowski, D. J., Murphy, L. O., & Manning, B. D. (2012). TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Molecular Cell*, *47*(4), 535-546. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.009>

Doerks, T., Strauss, M., Brendel, M., & Bork, P. (2000). GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, *25*(10), 483-485. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01664-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01664-9)

Dong, J., Du, X., Wang, H., Wang, J., Lu, C., Chen, X., Zhu, Z., Luo, Z., Yu, L., Brown, A. J., Yang, H., & Wu, J.-W. (2019). Allosteric enhancement of ORP1-mediated cholesterol transport by PI(4,5)P2/PI(3,4)P2. *Nature Communications*, *10*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08791-0>

Dong, X.-P., Wang, X., & Xu, H. (2010). TRP channels of intracellular membranes. *Journal of Neurochemistry*, *113*(2), 313-328. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06626.x>

Dowling, J. J., Joubert, R., Low, S. E., Durban, A. N., Messaddeq, N., Li, X., Dulin-Smith, A. N., Snyder, A. D., Marshall, M. L., Marshall, J. T., Beggs, A. H., Buj-Bello, A., & Pierson, C. R. (2012). Myotubular myopathy and the neuromuscular junction: A novel therapeutic approach from mouse models. *Disease Models & Mechanisms*, *5*(6), 852-859. <https://doi.org/10.1242/dmm.009746>

Dowling, J. J., Lawlor, M. W., & Das, S. (2002). *Myotubular Myopathy (MTM), XLCNM, X-Linked Centronuclear Myopathy, XLMTM*. <https://europepmc.org/books/n/gene/mtm/?extid=20301526&src=med>

Dowling, J. J., Low, S. E., Busta, A. S., & Feldman, E. L. (2010). Zebrafish MTMR14 is required for excitation–contraction coupling, developmental motor function and the regulation of autophagy. *Human Molecular Genetics*, *19*(13), 2668-2681. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq153>

Dowling, J. J., Vreede, A. P., Low, S. E., Gibbs, E. M., Kuwada, J. Y., Bonnemann, C. G., & Feldman, E. L. (2009). Loss of Myotubularin Function Results in T-Tubule Disorganization in Zebrafish and Human Myotubular Myopathy. *PLOS Genetics*, *5*(2), e1000372. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000372>

Egan, D., Kim, J., Shaw, R. J., & Guan, K.-L. (2011). The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy*, *7*(6), 643-644. <https://doi.org/10.4161/auto.7.6.15123>

Elverman, M., Goddard, M. A., Mack, D., Snyder, J. M., Lawlor, M. W., Meng, H., Beggs, A. H., Buj-Bello, A., Poulard, K., Marsh, A. P., Grange, R. W., Kelly, V. E., & Childers, M. K. (2017). Long-term effects of systemic gene therapy in a canine model of myotubular myopathy. *Muscle & Nerve*, *56*(5), 943-953. <https://doi.org/10.1002/mus.25658>

Eng, C. P., Sehgal, S. N., & Vezina, C. (1984). ACTIVITY OF RAPAMYCIN (AY-22, 989) AGAINST TRANSPLANTED TUMORS. *The Journal of Antibiotics*, *37*(10), 1231-1237. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.1231>

Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., & Chen, J. (2001). Phosphatidic Acid-Mediated Mitogenic Activation of mTOR Signaling. *Science*, *294*(5548), 1942-1945. <https://doi.org/10.1126/science.1066015>

Fauman, E. B., & Saper, M. A. (1996). Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends in Biochemical Sciences*, *21*(11), 413-417. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)10059-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)10059-1)

Ferguson, C. J., Lenk, G. M., & Meisler, M. H. (2009). Defective autophagy in neurons and astrocytes from mice deficient in PI(3,5)P2. *Human Molecular Genetics*, *18*(24), 4868-4878. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp460>

Fetalvero, K. M., Yu, Y., Goetschkes, M., Liang, G., Valdez, R. A., Gould, T., Triantafellow, E., Bergling, S., Loureiro, J., Eash, J., Lin, V., Porter, J. A., Finan, P. M., Walsh, K., Yang, Y., Mao, X., & Murphy, L. O. (2013). Defective Autophagy and mTORC1 Signaling in Myotubularin Null Mice. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.01075-12>

Fidziańska, A., Warlo, I., & Goebel, H. H. (1994). Neonatal Centronuclear Myopathy with N-Cam Decorated Myotubes. *Neuropediatrics*, 25(3), 158-161. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1073015>

Fili, N., Calleja, V., Woscholski, R., Parker, P. J., & Larijani, B. (2006). Compartmental signal modulation: Endosomal phosphatidylinositol 3-phosphate controls endosome morphology and selective cargo sorting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15473-15478. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607040103>

Fitzian, K., Brückner, A., Brohée, L., Zech, R., Antoni, C., Kiontke, S., Gasper, R., Linard Matos, A. L., Beel, S., Wilhelm, S., Gerke, V., Ungermann, C., Nellist, M., Raunser, S., Demetriades, C., Oeckinghaus, A., & Kümmel, D. (2021). TSC1 binding to lysosomal PIPs is required for TSC complex translocation and mTORC1 regulation. *Molecular Cell*, 81(13), 2705-2721.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.04.019>

Folch, J. (1948). *BRAIN DIPHOSPHOINOSITIDE, A NEW PHOSPHATIDE HAVING INOSITOL METADIPHOSPHATE AS A CONSTITUENT* | Elsevier Enhanced Reader. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)56993-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)56993-3)

Folch, J., & LeBaron, F. N. (1953). Isolation of phosphatido-peptides, a new group of brain phosphatides. *Fed.Proc*, 203.

Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S. A., & Sabatini, D. M. (2006). MSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct mTORC2s. *Current Biology*, 16(18), 1865-1870. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.001>

Fromm, S. A., Lawrence, R. E., & Hurley, J. H. (2020). Structural mechanism for amino acid-dependent Rag GTPase nucleotide state switching by SLC38A9. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(11), 1017-1023. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0490-9>

Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., & Jiang, X. (2009). ULK1·ATG13·FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy *. *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), 12297-12305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900573200>

Garami, A., Zwartkruis, F. J. T., Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., Stocker, H., Kozma, S. C., Hafen, E., Bos, J. L., & Thomas, G. (2003). Insulin Activation of Rheb, a Mediator of mTOR/S6K/4E-BP Signaling, Is Inhibited by TSC1 and 2. *Molecular Cell*, 11(6), 1457-1466. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00220-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00220-X)

Gavriilidis, C., Laredj, L., Solinhac, R., Messaddeq, N., Viaud, J., Laporte, J., Sumara, I., & Hnia, K. (2018). The MTM1–UBQLN2–HSP complex mediates degradation of misfolded

intermediate filaments in skeletal muscle. *Nature Cell Biology*, 20(2), 198-210. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0024-9>

Gayathri, N. (2000). Centronuclear myopathy--morphological relation to developing human skeletal muscle : A clinicopathological evaluation. *Neurology India*, 48(1), 19.

Gayi, E., Neff, L. A., Massana Muñoz, X., Ismail, H. M., Sierra, M., Mercier, T., Décosterd, L. A., Laporte, J., Cowling, B. S., Dorchie, O. M., & Scapozza, L. (2018). Tamoxifen prolongs survival and alleviates symptoms in mice with fatal X-linked myotubular myopathy. *Nature Communications*, 9(1), 4848. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07058-4>

Gu, X., Orozco, J. M., Saxton, R. A., Condon, K. J., Liu, G. Y., Krawczyk, P. A., Scaria, S. M., Harper, J. W., Gygi, S. P., & Sabatini, D. M. (2017). SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*, 358(6364), 813-818. <https://doi.org/10.1126/science.aao3265>

Gupta, A., Toscano, S., Trivedi, D., Jones, D. R., Mathre, S., Clarke, J. H., Divecha, N., & Ragu, P. (2013). Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase (PIP4K) regulates TOR signaling and cell growth during Drosophila development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 5963-5968. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219333110>

Gupta, V. A., Hnia, K., Smith, L. L., Gundry, S. R., McIntire, J. E., Shimazu, J., Bass, J. R., Talbot, E. A., Amoasii, L., Goldman, N. E., Laporte, J., & Beggs, A. H. (2013). Loss of Catalytically Inactive Lipid Phosphatase Myotubularin-related Protein 12 Impairs Myotubularin Stability and Promotes Centronuclear Myopathy in Zebrafish. *PLOS Genetics*, 9(6), e1003583. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003583>

Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*, 30(2), 214-226. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>

Han, J. M., Jeong, S. J., Park, M. C., Kim, G., Kwon, N. H., Kim, H. K., Ha, S. H., Ryu, S. H., & Kim, S. (2012). Leucyl-tRNA Synthetase Is an Intracellular Leucine Sensor for the mTORC1-Signaling Pathway. *Cell*, 149(2), 410-424. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.044>

Hannan, K. M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G. A., Pearson, R. B., & Hannan, R. D. (2003). MTOR-Dependent Regulation of Ribosomal Gene Transcription Requires S6K1 and Is Mediated by Phosphorylation of the Carboxy-Terminal Activation Domain of the Nucleolar

Transcription Factor UBF†. *Molecular and Cellular Biology*, 23(23), 8862-8877. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.23.8862-8877.2003>

Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M. T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q.-P., Kasuga, M., Nishimoto, I., & Avruch, J. (1997). Regulation of eIF-4E BP1 Phosphorylation by mTOR *. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26457-26463. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26457>

Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.-P., Kozlowski, M. T., Belham, C., & Avruch, J. (1998). Amino Acid Sufficiency and mTOR Regulate p70 S6 Kinase and eIF-4E BP1 through a Common Effector Mechanism *. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14484-14494. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14484>

Harrington, L. S., Findlay, G. M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N. R., Cheng, S., Shepherd, P. R., Gout, I., Downes, C. P., & Lamb, R. F. (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *Journal of Cell Biology*, 166(2), 213-223. <https://doi.org/10.1083/jcb.200403069>

Hasegawa, J., Iwamoto, R., Otomo, T., Nezu, A., Hamasaki, M., & Yoshimori, T. (2016). Autophagosome-lysosome fusion in neurons requires INPP5E, a protein associated with Joubert syndrome. *The EMBO Journal*, 35(17), 1853-1867. <https://doi.org/10.15252/emj.201593148>

Hasegawa, J., Strunk, B. S., & Weisman, L. S. (2017). PI5P and PI(3,5)P₂ : Minor, but Essential Phosphoinositides. *Cell Structure and Function*, *advpub*. <https://doi.org/10.1247/csf.17003>

Hatakeyama, R., Péli-Gulli, M.-P., Hu, Z., Jaquenoud, M., Garcia Osuna, G. M., Sardu, A., Dengjel, J., & De Virgilio, C. (2019). Spatially Distinct Pools of TORC1 Balance Protein Homeostasis. *Molecular Cell*, 73(2), 325-338.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.040>

Helliwell, T. R., Ellis, I. H., & Appleton, R. E. (1998). Myotubular myopathy : Morphological, immunohistochemical and clinical variation. *Neuromuscular Disorders*, 8(3), 152-161. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(98\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(98)00010-8)

Hirsch, D. S., Shen, Y., Dokmanovic, M., Yu, J., Mohan, N., Elzarrad, M. K., & Wu, W. J. (2014). Insulin activation of vacuolar protein sorting 34 mediates localized phosphatidylinositol 3-phosphate production at lamellipodia and activation of mTOR/S6K1. *Cellular Signalling*, 26(6), 1258-1268. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.02.009>

Hnia, K., Tronchère, H., Tomczak, K. K., Amoasii, L., Schultz, P., Beggs, A. H., Payraastre, B., Mandel, J. L., & Laporte, J. (2011). Myotubularin controls desmin intermediate

filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(1), 70-85. <https://doi.org/10.1172/JCI44021>

Hong, Z., Pedersen, N. M., Wang, L., Torgersen, M. L., Stenmark, H., & Raiborg, C. (2017). PtdIns3P controls mTORC1 signaling through lysosomal positioning. *Journal of Cell Biology*, 216(12), 4217-4233. <https://doi.org/10.1083/jcb.201611073>

Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: Transcriptional Mediators of Lipid Homeostasis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 67, 491-498. <https://doi.org/10.1101/sqb.2002.67.491>

Houchens, D. P., Ovejera, A. A., Riblet, S. M., & Slagel, D. E. (1983). Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 19(6), 799-805. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(83\)90012-3](https://doi.org/10.1016/0277-5379(83)90012-3)

Ikonomov, O. C., Sbrissa, D., Delvecchio, K., Feng, H.-Z., Cartee, G. D., Jin, J.-P., & Shisheva, A. (2013). Muscle-specific Pikfyve gene disruption causes glucose intolerance, insulin resistance, adiposity, and hyperinsulinemia but not muscle fiber-type switching. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 305(1), E119-E131. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00030.2013>

Ikonomov, O. C., Sbrissa, D., Delvecchio, K., Xie, Y., Jin, J.-P., Rappolee, D., & Shisheva, A. (2011). The Phosphoinositide Kinase PIKfyve Is Vital in Early Embryonic Development: PREIMPLANTATION LETHALITY OF PIKfyve^{-/-} EMBRYOS BUT NORMALITY OF PIKfyve^{+/-} MICE *. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13404-13413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.222364>

Ikonomov, O. C., Sbrissa, D., & Shisheva, A. (2006). Localized PtdIns 3,5-P₂ synthesis to regulate early endosome dynamics and fusion. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 291(2), C393-C404. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00019.2006>

Inoki, K., Li, Y., Xu, T., & Guan, K.-L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & Development*, 17(15), 1829-1834. <https://doi.org/10.1101/gad.1110003>

Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., Wang, C., He, X., MacDougald, O. A., You, M., Williams, B. O., & Guan, K.-L. (2006). TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell*, 126(5), 955-968. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.055>

Jin, N., Chow, C. Y., Liu, L., Zolov, S. N., Bronson, R., Davisson, M., Petersen, J. L., Zhang, Y., Park, S., Duex, J. E., Goldowitz, D., Meisler, M. H., & Weisman, L. S. (2008).

VAC14 nucleates a protein complex essential for the acute interconversion of PI3P and PI(3,5)P2 in yeast and mouse. *The EMBO Journal*, 27(24), 3221-3234. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.248>

Jin, N., Mao, K., Jin, Y., Tevzadze, G., Kauffman, E. J., Park, S., Bridges, D., Loewith, R., Saltiel, A. R., Klionsky, D. J., & Weisman, L. S. (2014). Roles for PI(3,5)P2 in nutrient sensing through TORC1. *Molecular Biology of the Cell*, 25(7), 1171-1185. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-01-0021>

Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C., & Laporte, J. (2008). Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 3(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-3-26>

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, 19(21), 5720-5728. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>

Kang, Y. J., Lu, M.-K., & Guan, K.-L. (2011). The TSC1 and TSC2 tumor suppressors are required for proper ER stress response and protect cells from ER stress-induced apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 18(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.82>

Kaplan, D. R., Whitman, M., Schaffhausen, B., Pallas, D. C., White, M., Cantley, L., & Roberts, T. M. (1987). Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation : 85 kd phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity. *Cell*, 50(7), 1021-1029. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90168-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90168-1)

Ketel, K., Krauss, M., Nicot, A.-S., Puchkov, D., Wieffer, M., Müller, R., Subramanian, D., Schultz, C., Laporte, J., & Haucke, V. (2016). A phosphoinositide conversion mechanism for exit from endosomes. *Nature*, 529(7586), 408-412. <https://doi.org/10.1038/nature16516>

Kilpatrick, B. S., Eden, E. R., Hockey, L. N., Yates, E., Futter, C. E., & Patel, S. (2017). An Endosomal NAADP-Sensitive Two-Pore Ca²⁺ Channel Regulates ER-Endosome Membrane Contact Sites to Control Growth Factor Signaling. *Cell Reports*, 18(7), 1636-1645. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.052>

Kim, D.-H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V. P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2003). GβL, a Positive Regulator of the Rapamycin-Sensitive Pathway Required for the Nutrient-Sensitive Interaction between Raptor and mTOR. *Molecular Cell*, 11(4), 895-904. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00114-X)

Kim, S.-A., Vacratsis, P. O., Firestein, R., Cleary, M. L., & Dixon, J. E. (2003). Regulation of myotubularin-related (MTMR)2 phosphatidylinositol phosphatase by MTMR5,

a catalytically inactive phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4492-4497. <https://doi.org/10.1073/pnas.0431052100>

Kim, Y.-M., Jung, C. H., Seo, M., Kim, E. K., Park, J.-M., Bae, S. S., & Kim, D.-H. (2015). MTORC1 Phosphorylates UVRAG to Negatively Regulate Autophagosome and Endosome Maturation. *Molecular Cell*, 57(2), 207-218. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.013>

Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., ... Tanaka, K. (2007). Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice. *Cell*, 131(6), 1149-1163. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.035>

Korolchuk, V. I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F. H., Roberts, E. A., Imarisio, S., Jahreiss, L., Sarkar, S., Futter, M., Menzies, F. M., O'Kane, C. J., Deretic, V., & Rubinsztein, D. C. (2011). Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nature Cell Biology*, 13(4), Art. 4. <https://doi.org/10.1038/ncb2204>

Kutchukian, C., Lo Scudato, M., Tourneur, Y., Poulard, K., Vignaud, A., Berthier, C., Allard, B., Lawlor, M. W., Buj-Bello, A., & Jacquemond, V. (2016). *Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition restores Ca²⁺ release defects and prolongs survival in myotubularin-deficient mice*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604099113>

Laporte, J., Blondeau, F., Gansmuller, A., Lutz, Y., Vonesch, J.-L., & Mandel, J.-L. (2002). The PtdIns3P phosphatase myotubularin is a cytoplasmic protein that also localizes to Rac1-inducible plasma membrane ruffles. *Journal of Cell Science*, 115(15), 3105-3117. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.15.3105>

Laporte, J., Hu, L. J., Kretz, C., Mandel, J.-L., Kioschis, P., Coy, J. F., Klauck, S. M., Poustka, A., & Dahl, N. (1996). A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nature Genetics*, 13(2), 175-182. <https://doi.org/10.1038/ng0696-175>

Laporte, J., Kress, W., & Mandel, J.-L. (2001). Diagnosis of X-linked myotubular myopathy by detection of myotubularin. *Annals of Neurology*, 50(1), 42-46. <https://doi.org/10.1002/ana.1033>

Lee, D.-F., Kuo, H.-P., Chen, C.-T., Hsu, J.-M., Chou, C.-K., Wei, Y., Sun, H.-L., Li, L.-Y., Ping, B., Huang, W.-C., He, X., Hung, J.-Y., Lai, C.-C., Ding, Q., Su, J.-L., Yang, J.-Y., Sahin, A. A., Hortobagyi, G. N., Tsai, F.-J., ... Hung, M.-C. (2007). IKK β Suppression of

TSC1 Links Inflammation and Tumor Angiogenesis via the mTOR Pathway. *Cell*, 130(3), 440-455. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.058>

Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, 132(1), 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>

Li, S. C., Diakov, T. T., Xu, T., Tarsio, M., Zhu, W., Couoh-Cardel, S., Weisman, L. S., & Kane, P. M. (2014). The signaling lipid PI(3,5)P2 stabilizes V1–Vo sector interactions and activates the V-ATPase. *Molecular Biology of the Cell*, 25(8), 1251-1262. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-10-0563>

Li, X., Wang, X., Zhang, X., Zhao, M., Tsang, W. L., Zhang, Y., Yau, R. G. W., Weisman, L. S., & Xu, H. (2013). Genetically encoded fluorescent probe to visualize intracellular phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate localization and dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(52), 21165-21170. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311864110>

Lips, D. L., Majerus, P. W., Gorga, F. R., Young, A. T., & Benjamin, T. L. (1989). Phosphatidylinositol 3-Phosphate Is Present in Normal and Transformed Fibroblasts and Is Resistant to Hydrolysis by Bovine Brain Phospholipase C II. *Journal of Biological Chemistry*, 264(15), 8759-8763. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81858-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81858-0)

Liu, G. Y., & Sabatini, D. M. (2020). MTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(4), 183-203. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>

Lo, W.-T., Zhang, Y., Vadas, O., Roske, Y., Gulluni, F., De Santis, M. C., Zagar, A. V., Stephanowitz, H., Hirsch, E., Liu, F., Daumke, O., Kudryashev, M., & Haucke, V. (2022). Structural basis of phosphatidylinositol 3-kinase C2 α function. *Nature Structural & Molecular Biology*, 29(3), Art. 3. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00730-w>

Lorenzo, Ó., Urbé, S., & Clague, M. J. (2006). Systematic analysis of myotubularins : Heteromeric interactions, subcellular localisation and endosomelated functions. *Journal of Cell Science*, 119(14), 2953-2959. <https://doi.org/10.1242/jcs.03040>

Luzio, J. P., Pryor, P. R., & Bright, N. A. (2007). Lysosomes : Fusion and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), Art. 8. <https://doi.org/10.1038/nrm2217>

Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Pandolfi, P. P. (2005). Phosphorylation and Functional Inactivation of TSC2 by Erk : Implications for Tuberous Sclerosis and Cancer Pathogenesis. *Cell*, 121(2), 179-193. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.031>

Macara, I. G., Marinetti, G. V., & Balduzzi, P. C. (1984). Transforming protein of avian sarcoma virus UR2 is associated with phosphatidylinositol kinase activity: Possible role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(9), 2728-2732. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.9.2728>

Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J., & Cantley, L. C. (2002). Identification of the Tuberous Sclerosis Complex-2 Tumor Suppressor Gene Product Tuberin as a Target of the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway. *Molecular Cell*, *10*(1), 151-162. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00568-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00568-3)

Marat, A. L., Wallroth, A., Lo, W.-T., Müller, R., Norata, G. D., Falasca, M., Schultz, C., & Haucke, V. (2017). mTORC1 activity repression by late endosomal phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate. *Science*, *356*(6341), 968-972. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8310>

Martel, R. R., Klicius, J., & Galet, S. (1977). Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *55*(1), 48-51. <https://doi.org/10.1139/y77-007>

Martin, S., Harper, C. B., May, L. M., Coulson, E. J., Meunier, F. A., & Osborne, S. L. (2013). Inhibition of PIKfyve by YM-201636 Dysregulates Autophagy and Leads to Apoptosis-Independent Neuronal Cell Death. *PLOS ONE*, *8*(3), e60152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060152>

Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., Metzger, D., Reggiani, C., Schiaffino, S., & Sandri, M. (2009). Autophagy Is Required to Maintain Muscle Mass. *Cell Metabolism*, *10*(6), 507-515. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.008>

Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., & Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes & Development*, *18*(4), 423-434. <https://doi.org/10.1101/gad.285504>

McEntagart, M., Parsons, G., Buj-Bello, A., Biancalana, V., Fenton, I., Little, M., Krawczak, M., Thomas, N., Herman, G., Clarke, A., & Wallgren-Pettersson, C. (2002). Genotype-phenotype correlations in X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscular Disorders*, *12*(10), 939-946. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(02\)00153-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(02)00153-0)

Medina, D. L., Di Paola, S., Peluso, I., Armani, A., De Stefani, D., Venditti, R., Montefusco, S., Scotto-Rosato, A., Prezioso, C., Forrester, A., Settembre, C., Wang, W., Gao, Q., Xu, H., Sandri, M., Rizzuto, R., De Matteis, M. A., & Ballabio, A. (2015). Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nature Cell Biology*, *17*(3), 288-299. <https://doi.org/10.1038/ncb3114>

Menon, S., Dibble, C. C., Talbott, G., Hoxhaj, G., Valvezan, A. J., Takahashi, H., Cantley, L. C., & Manning, B. D. (2014). Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome. *Cell*, *156*(4), 771-785. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.049>

Min, S. H., Suzuki, A., Stalker, T. J., Zhao, L., Wang, Y., McKennan, C., Riese, M. J., Guzman, J. F., Zhang, S., Lian, L., Joshi, R., Meng, R., Seeholzer, S. H., Choi, J. K., Koretzky, G., Marks, M. S., & Abrams, C. S. (2014). Loss of PIKfyve in platelets causes a lysosomal disease leading to inflammation and thrombosis in mice. *Nature Communications*, *5*(1), 4691. <https://doi.org/10.1038/ncomms5691>

Mochizuki, Y., & Majerus, P. W. (2003). Characterization of myotubularin-related protein 7 and its binding partner, myotubularin-related protein 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(17), 9768-9773. <https://doi.org/10.1073/pnas.1333958100>

Mohan, N., Shen, Y., Dokmanovic, M., Endo, Y., Hirsch, D. S., & Wu, W. J. (2016). VPS34 regulates TSC1/TSC2 heterodimer to mediate RheB and mTORC1/S6K1 activation and cellular transformation. *Oncotarget*, *7*(32), 52239-52254. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10469>

Morita, M., Gravel, S.-P., Chénard, V., Sikström, K., Zheng, L., Alain, T., Gandin, V., Avizonis, D., Arguello, M., Zakaria, C., McLaughlan, S., Nouet, Y., Pause, A., Pollak, M., Gottlieb, E., Larsson, O., St-Pierre, J., Topisirovic, I., & Sonenberg, N. (2013). mTORC1 Controls Mitochondrial Activity and Biogenesis through 4E-BP-Dependent Translational Regulation. *Cell Metabolism*, *18*(5), 698-711. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.001>

Nakatsu, F., Perera, R. M., Lucast, L., Zoncu, R., Domin, J., Gertler, F. B., Toomre, D., & De Camilli, P. (2010). The inositol 5-phosphatase SHIP2 regulates endocytic clathrin-coated pit dynamics. *Journal of Cell Biology*, *190*(3), 307-315. <https://doi.org/10.1083/jcb.201005018>

Nandurkar, H. H., Caldwell, K. K., Whisstock, J. C., Layton, M. J., Gaudet, E. A., Norris, F. A., Majerus, P. W., & Mitchell, C. A. (2001). Characterization of an adapter subunit to a phosphatidylinositol (3)P 3-phosphatase : Identification of a myotubularin-related protein lacking catalytic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(17), 9499-9504. <https://doi.org/10.1073/pnas.171306098>

Nandurkar, H. H., Layton, M., Laporte, J., Selan, C., Corcoran, L., Caldwell, K. K., Mochizuki, Y., Majerus, P. W., & Mitchell, C. A. (2003). Identification of myotubularin as the lipid phosphatase catalytic subunit associated with the 3-phosphatase adapter protein, 3-PAP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(15), 8660-8665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1033097100>

Napolitano, G., & Ballabio, A. (2016). TFEB at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(13), 2475-2481. <https://doi.org/10.1242/jcs.146365>

Noguchi, S., Fujita, M., Murayama, K., Kurokawa, R., & Nishino, I. (2005). Gene expression analyses in X-linked myotubular myopathy. *Neurology*, 65(5), 732-737. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000174625.67484.4d>

Obara, K., Sekito, T., Niimi, K., & Ohsumi, Y. (2008). The Atg18-Atg2 Complex Is Recruited to Autophagic Membranes via Phosphatidylinositol 3-Phosphate and Exerts an Essential Function *. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), 23972-23980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803180200>

Pearce, L. R., Huang, X., Boudeau, J., Pawłowski, R., Wullschleger, S., Deak, M., Ibrahim, A. F. M., Gurlay, R., Magnuson, M. A., & Alessi, D. R. (2007). Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochemical Journal*, 405(3), 513-522. <https://doi.org/10.1042/BJ20070540>

Perera, R. M., Stoykova, S., Nicolay, B. N., Ross, K. N., Fitamant, J., Boukhali, M., Lengrand, J., Deshpande, V., Selig, M. K., Ferrone, C. R., Settleman, J., Stephanopoulos, G., Dyson, N. J., Zoncu, R., Ramaswamy, S., Haas, W., & Bardeesy, N. (2015). Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature*, 524(7565), 361-365. <https://doi.org/10.1038/nature14587>

Perera, R. M., Zoncu, R., Lucast, L., De Camilli, P., & Toomre, D. (2006). Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(51), 19332-19337. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609795104>

Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S., & Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival. *Cell*, 137(5), 873-886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.046>

Peterson, T. R., Sengupta, S. S., Harris, T. E., Carmack, A. E., Kang, S. A., Balderas, E., Guertin, D. A., Madden, K. L., Carpenter, A. E., Finck, B. N., & Sabatini, D. M. (2011). *mTOR Complex 1 Regulates Lipin 1 Localization to Control the SREBP Pathway—ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411007094>

Pierson, C. R., Agrawal, P. B., Blasko, J., & Beggs, A. H. (2007). Myofiber size correlates with MTM1 mutation type and outcome in X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscular Disorders*, 17(7), 562-568. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.03.010>

Posor, Y., Eichhorn-Grünig, M., & Haucke, V. (2015). Phosphoinositides in endocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(6), 794-804. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.014>

Posor, Y., Jang, W., & Haucke, V. (2022). Phosphoinositides as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-20. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00490-x>

Rabanal-Ruiz, Y., Byron, A., Wirth, A., Madsen, R., Sedlackova, L., Hewitt, G., Nelson, G., Stingele, J., Wills, J. C., Zhang, T., Zeug, A., Fässler, R., Vanhaesebroeck, B., Maddocks, O. D. K., Ponimaskin, E., Carroll, B., & Korolchuk, V. I. (2021). mTORC1 activity is supported by spatial association with focal adhesions. *Journal of Cell Biology*, 220(5), e202004010. <https://doi.org/10.1083/jcb.202004010>

Raben, N., Hill, V., Shea, L., Takikita, S., Baum, R., Mizushima, N., Ralston, E., & Plotz, P. (2008). Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Human Molecular Genetics*, 17(24), 3897-3908. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn292>

Raess, M. A., Cowling, B. S., Bertazzi, D. L., Kretz, C., Rinaldi, B., Xuereb, J.-M., Kessler, P., Romero, N. B., Payrastre, B., Friant, S., & Laporte, J. (2017). Expression of the neuropathy-associated MTMR2 gene rescues MTM1-associated myopathy. *Human Molecular Genetics*, 26(19), 3736-3748. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx258>

Ribeiro, I., Yuan, L., Tanentzapf, G., Dowling, J. J., & Kiger, A. (2011). Phosphoinositide Regulation of Integrin Trafficking Required for Muscle Attachment and Maintenance. *PLOS Genetics*, 7(2), e1001295. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001295>

Rogala, K. B., Gu, X., Kedir, J. F., Abu-Remaileh, M., Bianchi, L. F., Bottino, A. M. S., Dueholm, R., Niehaus, A., Overwijn, D., Fils, A.-C. P., Zhou, S. X., Leary, D., Laqtom, N. N., Brignole, E. J., & Sabatini, D. M. (2019). Structural basis for the docking of mTORC1 on the lysosomal surface. *Science*, 366(6464), 468-475. <https://doi.org/10.1126/science.aay0166>

Romero, N. B. (2010). Centronuclear myopathies: A widening concept. *Neuromuscular Disorders*, 20(4), 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.01.014>

Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., & Snyder, S. H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78(1), 35-43. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90570-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90570-3)

Sabha, N., Volpatti, J. R., Gonorazky, H., Reifler, A., Davidson, A. E., Li, X., Eltayeb, N. M., Dall'Armi, C., Paolo, G. D., Brooks, S. V., Buj-Bello, A., Feldman, E. L., & Dowling, J. J. (2016). PIK3C2B inhibition improves function and prolongs survival in myotubular

myopathy animal models. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(9), 3613-3625. <https://doi.org/10.1172/JCI86841>

Saffi, G. T., & Botelho, R. J. (2019). Lysosome Fission : Planning for an Exit. *Trends in Cell Biology*, 29(8), 635-646. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.05.003>

Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., & Sabatini, D. M. (2010). Ragulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids. *Cell*, 141(2), 290-303. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.024>

Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2008). The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to mTORC1. *Science*, 320(5882), 1496-1501. <https://doi.org/10.1126/science.1157535>

Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A., & Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Molecular Cell*, 25(6), 903-915. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.003>

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhard, A. L., & Sabatini, D. M. (2006). Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*, 22(2), 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.029>

Sarnat, H. B. (1990). Myotubular Myopathy : Arrest of Morphogenesis of Myofibres Associated with Persistence of Fetal Vimentin and Desmin Four cases compared with fetal and neonatal muscle. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 17(2), 109-123. <https://doi.org/10.1017/S0317167100030304>

Saxton, R. A., Knockenhauer, K. E., Wolfson, R. L., Chantranupong, L., Pacold, M. E., Wang, T., Schwartz, T. U., & Sabatini, D. M. (2016). Structural basis for leucine sensing by the Sestrin2-mTORC1 pathway. *Science*, 351(6268), 53-58. <https://doi.org/10.1126/science.aad2087>

Schalm, S. S., Fingar, D. C., Sabatini, D. M., & Blenis, J. (2003). TOS Motif-Mediated Raptor Binding Regulates 4E-BP1 Multisite Phosphorylation and Function. *Current Biology*, 13(10), 797-806. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00329-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00329-4)

Schink, K. O., Raiborg, C., & Stenmark, H. (2013). Phosphatidylinositol 3-phosphate, a lipid that regulates membrane dynamics, protein sorting and cell signalling. *BioEssays*, 35(10), 900-912. <https://doi.org/10.1002/bies.201300064>

Schöneberg, J., Lehmann, M., Ullrich, A., Posor, Y., Lo, W.-T., Lichtner, G., Schmoranz, J., Haucke, V., & Noé, F. (2017). Lipid-mediated PX-BAR domain recruitment couples local membrane constriction to endocytic vesicle fission. *Nature Communications*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms15873>

Shen, J., Yu, W.-M., Brotto, M., Scherman, J. A., Guo, C., Stoddard, C., Nosek, T. M., Valdivia, H. H., & Qu, C.-K. (2009). Deficiency of MIP/MTMR14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca²⁺ homeostasis. *Nature Cell Biology*, 11(6), 769-776. <https://doi.org/10.1038/ncb1884>

Shen, K., Choe, A., & Sabatini, D. M. (2017). Intersubunit Crosstalk in the Rag GTPase Heterodimer Enables mTORC1 to Respond Rapidly to Amino Acid Availability. *Molecular Cell*, 68(3), 552-565.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.026>

Shen, K., Huang, R. K., Brignole, E. J., Condon, K. J., Valenstein, M. L., Chantranupong, L., Bomaliyamu, A., Choe, A., Hong, C., Yu, Z., & Sabatini, D. M. (2018). Architecture of the human GATOR1 and GATOR1–Rag GTPases complexes. *Nature*, 556(7699), Art. 7699. <https://doi.org/10.1038/nature26158>

Shin, H. R., Citron, Y. R., Wang, L., Tribouillard, L., Goul, C. S., Stipp, R., Sugasawa, Y., Jain, A., Samson, N., Lim, C.-Y., Davis, O. B., Castaneda-Carpio, D., Qian, M., Nomura, D. K., Perera, R. M., Park, E., Covey, D. F., Laplante, M., Evers, A. S., & Zoncu, R. (2022). Lysosomal GPCR-like protein LYCHOS signals cholesterol sufficiency to mTORC1. *Science*, 377(6612), 1290-1298. <https://doi.org/10.1126/science.abg6621>

Shin, H.-W., Hayashi, M., Christoforidis, S., Lacas-Gervais, S., Hoepfner, S., Wenk, M. R., Modregger, J., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Nystuen, A., Frankel, W. N., Solimena, M., De Camilli, P., & Zerial, M. (2005). An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *Journal of Cell Biology*, 170(4), 607-618. <https://doi.org/10.1083/jcb.200505128>

Sidransky, E., Nalls, M. A., Aasly, J. O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E. R., Bar-Shira, A., Berg, D., Bras, J., Brice, A., Chen, C.-M., Clark, L. N., Condroyer, C., De Marco, E. V., Dürr, A., Eblan, M. J., Fahn, S., Farrer, M. J., Fung, H.-C., ... Ziegler, S. G. (2009). Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*, 361(17), 1651-1661. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0901281>

Silhankova, M., Port, F., Harterink, M., Basler, K., & Korswagen, H. C. (2010). Wnt signalling requires MTM-6 and MTM-9 myotubularin lipid-phosphatase function in Wnt-producing cells. *The EMBO Journal*, 29(24), 4094-4105. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.278>

Smets, K. (2008). X-linked myotubular myopathy and chylothorax. *Neuromuscular Disorders*, 18(2), 183-184. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.10.004>

Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C. M., & Ellisen, L. W. (2005). Regulation of mTOR and Cell Growth in Response to Energy Stress by REDD1. *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), 5834-5845. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.5834-5845.2005>

Stephens, L., Hawkins, P. T., & Downes, C. P. (1989). Metabolic and structural evidence for the existence of a third species of polyphosphoinositide in cells : D-phosphatidylmyo-inositol 3-phosphate. *Biochemical Journal*, 259(1), 267-276. <https://doi.org/10.1042/bj2590267>

Stuttfield, E., Aylett, C. H., Imseng, S., Boehringer, D., Scaiola, A., Sauer, E., Hall, M. N., Maier, T., & Ban, N. (2018). Architecture of the human mTORC2 core complex. *eLife*, 7, e33101. <https://doi.org/10.7554/eLife.33101>

Su, M.-Y., Morris, K. L., Kim, D. J., Fu, Y., Lawrence, R., Stjepanovic, G., Zoncu, R., & Hurley, J. H. (2017). Hybrid Structure of the RagA/C-Ragulator mTORC1 Activation Complex. *Molecular Cell*, 68(5), 835-846.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.016>

Taguchi-Atarashi, N., Hamasaki, M., Matsunaga, K., Omori, H., Ktistakis, N. T., Yoshimori, T., & Noda, T. (2010). Modulation of Local PtdIns3P Levels by the PI Phosphatase MTMR3 Regulates Constitutive Autophagy. *Traffic*, 11(4), 468-478. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01034.x>

Takasuga, S., Horie, Y., Sasaki, J., Sun-Wada, G.-H., Kawamura, N., Iizuka, R., Mizuno, K., Eguchi, S., Kofuji, S., Kimura, H., Yamazaki, M., Horie, C., Odanaga, E., Sato, Y., Chida, S., Kontani, K., Harada, A., Katada, T., Suzuki, A., ... Sasaki, T. (2013). Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5), 1726-1731. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213212110>

Takatori, S., & Fujimoto, T. (2016). A novel imaging method revealed phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-rich domains in the endosome/lysosome membrane. *Communicative & Integrative Biology*, 9(2), e1145319. <https://doi.org/10.1080/19420889.2016.1145319>

Tasfaout, H., Lionello, V. M., Kretz, C., Koebel, P., Messaddeq, N., Bitz, D., Laporte, J., & Cowling, B. S. (2018). Single Intramuscular Injection of AAV-shRNA Reduces DNMT2 and Prevents Myotubular Myopathy in Mice. *Molecular Therapy*, 26(4), 1082-1092. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.02.008>

Tee, A. R., Manning, B. D., Roux, P. P., Cantley, L. C., & Blenis, J. (2003). Tuberous Sclerosis Complex Gene Products, Tuberin and Hamartin, Control mTOR Signaling by Acting as a GTPase-Activating Protein Complex toward Rheb. *Current Biology*, *13*(15), 1259-1268. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00506-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00506-2)

Thoreen, C. C., Chantranupong, L., Keys, H. R., Wang, T., Gray, N. S., & Sabatini, D. M. (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*, *485*(7396), Art. 7396. <https://doi.org/10.1038/nature11083>

Tsujita, K., Itoh, T., Ijuin, T., Yamamoto, A., Shisheva, A., Laporte, J., & Takenawa, T. (2004). Myotubularin Regulates the Function of the Late Endosome through the GRAM Domain-Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate Interaction *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(14), 13817-13824. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312294200>

Velichkova, M., Juan, J., Kadandale, P., Jean, S., Ribeiro, I., Raman, V., Stefan, C., & Kiger, A. A. (2010). Drosophila Mtm and class II PI3K coregulate a PI(3)P pool with cortical and endolysosomal functions. *Journal of Cell Biology*, *190*(3), 407-425. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911020>

Vézina, C., Kudelski, A., & Sehgal, S. N. (1975). RAPAMYCIN (AY-22, 989), A NEW ANTIFUNGAL ANTIBIOTIC I. TAXONOMY OF THE PRODUCING STREPTOMYCETE AND ISOLATION OF THE ACTIVE PRINCIPLE. *The Journal of Antibiotics*, *28*(10), 721-726. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.721>

Viaud, J., Mansour, R., Antkowiak, A., Mujalli, A., Valet, C., Chicanne, G., Xuereb, J.-M., Terrisse, A.-D., Séverin, S., Gratacap, M.-P., Gaits-Iacovoni, F., & Payrastre, B. (2016). Phosphoinositides : Important lipids in the coordination of cell dynamics. *Biochimie*, *125*, 250-258. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.005>

Vicinanza, M., Korolchuk, V. I., Ashkenazi, A., Puri, C., Menzies, F. M., Clarke, J. H., & Rubinsztein, D. C. (2015). PI(5)P Regulates Autophagosome Biogenesis. *Molecular Cell*, *57*(2), 219-234. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.007>

Wallroth, A., Koch, P. A., Marat, A. L., Krause, E., & Haucke, V. (2019). Protein kinase N controls a lysosomal lipid switch to facilitate nutrient signalling via mTORC1. *Nature Cell Biology*, *21*(9), Art. 9. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0377-3>

Wang, H., Loerke, D., Bruns, C., Müller, R., Koch, P.-A., Puchkov, D., Schultz, C., & Haucke, V. (2020). Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate synthesis and turnover are spatially segregated in the endocytic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(4), 1091-1104. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)49918-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)49918-2)

Wang, S., Tsun, Z.-Y., Wolfson, R. L., Shen, K., Wyant, G. A., Plovanich, M. E., Yuan, E. D., Jones, T. D., Chantranupong, L., Comb, W., Wang, T., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Straub, C., Kim, C., Park, J., Sabatini, B. L., & Sabatini, D. M. (2015). Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1257132>

Wang, X., Zhang, X., Dong, X., Samie, M., Li, X., Cheng, X., Goschka, A., Shen, D., Zhou, Y., Harlow, J., Zhu, M. X., Clapham, D. E., Ren, D., & Xu, H. (2012). TPC Proteins Are Phosphoinositide- Activated Sodium-Selective Ion Channels in Endosomes and Lysosomes. *Cell*, *151*(2), 372-383. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.036>

Whitman, M., Downes, C. P., Keeler, M., Keller, T., & Cantley, L. (1988). Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature*, *332*(6165), Art. 6165. <https://doi.org/10.1038/332644a0>

Whitman, M., Kaplan, D. R., Schaffhausen, B., Cantley, L., & Roberts, T. M. (1985). Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature*, *315*(6016), Art. 6016. <https://doi.org/10.1038/315239a0>

Wilhelm, L. P., Wendling, C., Védie, B., Kobayashi, T., Chenard, M.-P., Tomasetto, C., Drin, G., & Alpy, F. (2017). STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *The EMBO Journal*, *36*(10), 1412-1433. <https://doi.org/10.15252/embj.201695917>

Wishart, M. J., & Dixon, J. E. (2002). PTEN and myotubularin phosphatases : From 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease. *Trends in Cell Biology*, *12*(12), 579-585. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(02\)02412-1](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(02)02412-1)

Wolfson, R. L., Chantranupong, L., Saxton, R. A., Shen, K., Scaria, S. M., Cantor, J. R., & Sabatini, D. M. (2016). Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*, *351*(6268), 43-48. <https://doi.org/10.1126/science.aab2674>

Wyant, G. A., Abu-Remaileh, M., Wolfson, R. L., Chen, W. W., Freinkman, E., Danai, L. V., Vander Heiden, M. G., & Sabatini, D. M. (2017). MTORC1 Activator SLC38A9 Is Required to Efflux Essential Amino Acids from Lysosomes and Use Protein as a Nutrient. *Cell*, *171*(3), 642-654.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.046>

Xue, Y., Fares, H., Grant, B., Li, Z., Rose, A. M., Clark, S. G., & Skolnik, E. Y. (2003). Genetic Analysis of the Myotubularin Family of Phosphatases in *Caenorhabditis elegans* *. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(36), 34380-34386. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303259200>

Yang, H., Jiang, X., Li, B., Yang, H. J., Miller, M., Yang, A., Dhar, A., & Pavletich, N. P. (2017). Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature*, 552(7685), Art. 7685. <https://doi.org/10.1038/nature25023>

Yang, H., Rudge, D. G., Koos, J. D., Vaidialingam, B., Yang, H. J., & Pavletich, N. P. (2013). MTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, 497(7448), Art. 7448. <https://doi.org/10.1038/nature12122>

Yip, C. K., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D. M., & Kang, S. A. (2010). Structure of the Human mTOR Complex I and Its Implications for Rapamycin Inhibition. *Molecular Cell*, 38(5), 768-774. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.017>

Yoon, M.-S., Son, K., Arauz, E., Han, J. M., Kim, S., & Chen, J. (2016). Leucyl-tRNA Synthetase Activates Vps34 in Amino Acid-Sensing mTORC1 Signaling. *Cell Reports*, 16(6), 1510-1517. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.008>

Yoshida, S., Hong, S., Suzuki, T., Nada, S., Mannan, A. M., Wang, J., Okada, M., Guan, K.-L., & Inoki, K. (2011). Redox Regulates Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Activity by Modulating the TSC1/TSC2-Rheb GTPase Pathway *. *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), 32651-32660. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238014>

Zhang, C.-S., Jiang, B., Li, M., Zhu, M., Peng, Y., Zhang, Y.-L., Wu, Y.-Q., Li, T. Y., Liang, Y., Lu, Z., Lian, G., Liu, Q., Guo, H., Yin, Z., Ye, Z., Han, J., Wu, J.-W., Yin, H., Lin, S.-Y., & Lin, S.-C. (2014). The Lysosomal v-ATPase-Ragulator Complex Is a Common Activator for AMPK and mTORC1, Acting as a Switch between Catabolism and Anabolism. *Cell Metabolism*, 20(3), 526-540. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.06.014>

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., Meisler, M. H., & Weisman, L. S. (2007). Loss of Vac14, a regulator of the signaling lipid phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate, results in neurodegeneration in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(44), 17518-17523. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702275104>

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., Saltiel, A. R., Meisler, M. H., Russell, M. W., & Weisman, L. S. (2012). In vivo, Pikfyve generates PI(3,5)P2, which serves as both a signaling lipid and the major precursor for PI5P. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(43), 17472-17477. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203106109>

ANNEXE

ARTICLE 1

Mansat, M., Picot, M., Chicanne, G., Nahoum, V., Gaits-Iacovoni, F., Payrastre, B., ... & Viaud, J. (2021). Liposome-Based Methods to Study Protein-Phosphoinositide Interaction.

Methods in molecular biology (Clifton, NJ), 2251, 177-184.



Chapter 12

Liposome-Based Methods to Study Protein–Phosphoinositide Interaction

Mélanie Mansat, Mélanie Picot, Gaëtan Chicanne, Virginie Nahoum, Frédérique Gaits-Iacovoni, Bernard Payrastre, Karim Hnia, and Julien Viaud

Abstract

Following their generation by lipid kinases and phosphatases, phosphoinositides regulate important biological processes such as cytoskeleton rearrangement, membrane remodeling/trafficking, and gene expression through the interaction of their phosphorylated inositol head group with a variety of protein domains such as PH, PX, and FYVE. Therefore, it is important to determine the specificity of phosphoinositides toward effector proteins to understand their impact on cellular physiology. Several methods have been developed to identify and characterize phosphoinositide effectors, and liposomes-based methods are preferred because the phosphoinositides are incorporated in a membrane, the composition of which can mimic cellular membranes. In this report, we describe the experimental setup for liposome flotation assay and a recently developed method called protein–lipid interaction by fluorescence (PLIF) for the characterization of phosphoinositide-binding specificities of proteins.

Key words Phosphoinositide, Protein–lipid interaction, Liposome, Liposome flotation, Protein–lipid interaction by fluorescence

1 Introduction

Phosphoinositide (PIP) [1]-binding specificity can be analyzed by different techniques such as lipid–protein overlay assay, isothermal titration calorimetry (ITC), surface plasmon resonance (SPR), liposome sedimentation or flotation, and more recently by protein–lipid interaction by fluorescence (PLIF) [2–5]. The liposome-based methods are considered more robust because PIPs are presented in a membrane with a defined composition that can mimic cellular compartments and are less prone to detect false-positive interactions. Some of them are quantitative (SPR, ITC) but require either expensive materials and/or high amounts of lipids and proteins and are used as a second approach to determine affinities and thermodynamic parameters. As a first approach, liposome sedimentation or

flotation is often used (Fig. 1), and liposome flotation is preferred to avoid false-positive or overestimated interaction, considering that some proteins have tendency to precipitate [4].

Briefly, in the flotation assay, the protein of interest is incubated with liposomes that contain a phospholipid matrix (POPC, POPE, and fluorescent PE that is useful to detect the liposomes) and each different PIP. Following an incubation period, a sucrose gradient is applied that will separate liposome-bound proteins (top low-density fraction) from unbound proteins after ultracentrifugation. Then, fractions are collected and analyzed by SDS-PAGE followed by western blot analysis or Coomassie blue staining (Fig. 1). The advantage of this assay is the use of liposomes of various sizes (obtained by sequential extrusion) that allows studying the effect of membrane curvature on protein binding. However, this method is time-consuming and allows the simultaneous processing of only few experimental samples.

More recently, we developed the PLIF assay that lies on the use of 96-well plates to screen protein–PIP specificity in less than 1 h with access to relative affinities [5]. PLIF is based on the use of glutathione-coated plates that will pull down glutathione S-transferase (GST)-tagged proteins and interacting PIP-containing fluorescent liposomes (Fig. 2). Following a single wash, PIP specificity is simply measured through fluorescence reading (Fig. 2). Despite that this assay requires the use of GST-tagged recombinant proteins, the PLIF strategy has significant advantages compared to other methods in terms of execution speed and experimental setup (Fig. 2).

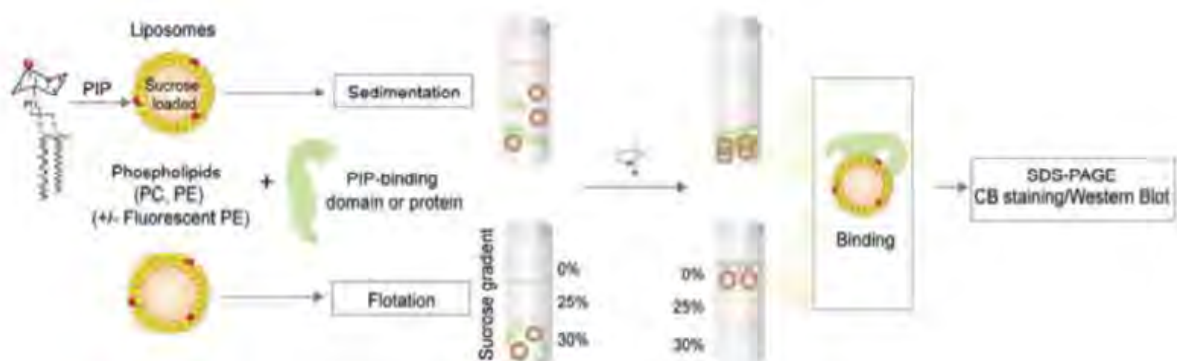


Fig. 1 Experimental principles of liposome sedimentation and flotation assays. Liposomes containing a given PIP are incubated with recombinant PIP-binding domain or protein and subjected to sedimentation or flotation using sucrose gradient. The binding reaction is then analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue (CB) staining or western blot detection

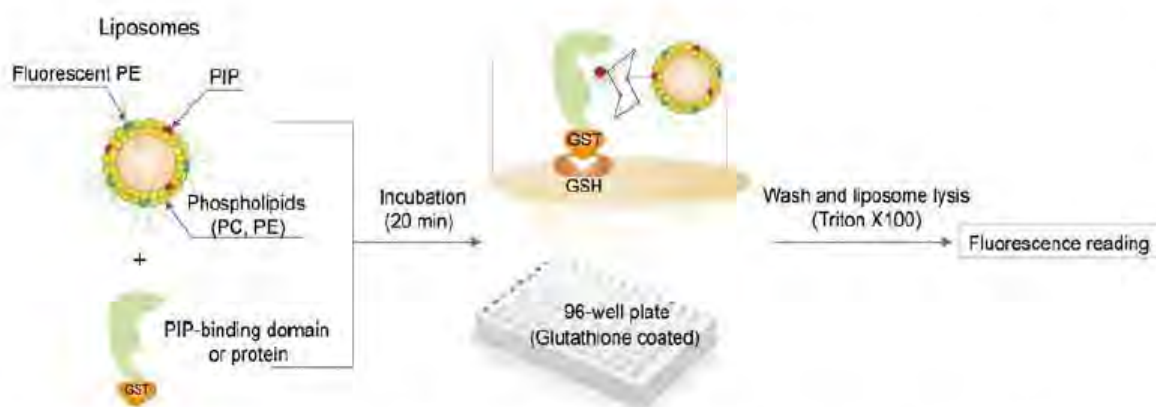


Fig. 2 Experimental principles of the PLIF assay. Each GST-tagged protein is incubated on glutathione-coated plates with fluorescent liposome preparations containing a given PIP. The binding reaction is proportional to fluorescent signal intensity of the bound liposomes

2 Materials

2.1 Liposome Preparation

Liposomes are composed of phospholipids (POPC and POPE) and a fluorescent lipid (carboxyfluorescein-PE) (molar ratio: 70:28:2) to follow the liposomes, with or without 1% of a given PIP taken at the expense of POPC (*see Note 1*).

1. 10 mg/mL 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) in chloroform/methanol in a ratio of 1/1 (v/v). Store at -20°C up to 6 months (*see Note 2*).
2. 10 mg/mL 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE) in chloroform/methanol in a ratio of 1/1 (v/v). Store at -20°C up to 6 months (*see Note 2*).
3. 1 mg/mL carboxyfluorescein-phosphoethanolamine (CF-PE). Store at -20°C up to 6 months (*see Note 2*).
4. 1 mM PtdIns3P, PtdIns4P, PtdIns5P, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₂, and PtdIns(3,4,5)P₃ in chloroform/methanol in a ratio of 1/1 (v/v). Store at -20°C up to 6 months (*see Note 2*).
5. Liposome resuspension buffer: PBS containing 150 mM potassium acetate. Prepare 5 mL (*see Note 3*).
6. Nitrogen evaporator.
7. Vacuum dessicator.
8. Water bath sonicator.

2.2 Liposome Flotation

1. 1 mM fluorescent PIP-containing liposomes (*see Subheading 2.1*).
2. Ultracentrifuge that can adapt ~ 1 mL thickwall polycarbonate tubes.
3. 60% and 25% sucrose solutions in PBS (w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$): dissolve the sucrose in PBS and check density with a

refractometer and adjust with PBS. To make the 60% sucrose solution, it is easier to check a twofold dilution of a sample with the refractometer and to adjust the mother solution until a 30% solution is obtained. Prepare ~10 mL of each solution. Sucrose stock solutions can be stored at 4 °C (*see Note 3*).

4. Portable UV lamp.

2.3 Protein–Lipid Interaction by Fluorescence (PLIF)

1. GST-tag recombinant protein (well dialyzed, *see Note 4*). 8 µg of protein is necessary for each experiment and depending on the number of samples.
2. 1 mM fluorescent phosphoinositide-containing liposomes (*see Subheading 2.1*).
3. Liposome-binding buffer: PBS (w/o Ca²⁺/Mg²⁺) containing 150 mM potassium acetate and 1 mM MgCl₂. Prepare 50 mL (*see Note 3*).
4. Liposome lysis buffer: PBS (w/o Ca²⁺/Mg²⁺) containing 1% (v/v) Triton X-100. Prepare 50 mL.
5. Glutathione-coated plates, clear, 8-well strip (Thermo Scientific Pierce).
6. Multichannel pipette (for 100 and 200 µL pipetting).
7. Reagent reservoir for multichannel pipette.
8. Fluorescence plate reader for 96-well microtiter plate.

3 Methods

3.1 Liposome Preparation

This protocol describes how to prepare liposomes that can be used for liposome flotation or PLIF assay. During lipid mixing, to limit solvent evaporation, keep the lipid stocks and prepare lipid mixtures on ice.

1. 200 µL of 1 mM liposome suspension composed of POPC:POPE:CF-PE (molar ratio: 70:28:2) and POPC:POPE:CF-PE:PIP (molar ratio: 69:28:2:1) is a good starting point for multiple experiments during 2 days. In glass tubes labeled for each PIP, add the different phospholipids (POPC, POPE, CF-PE ± PIP) in 200 µL final volume of chloroform. For control liposomes, in 181 µL of chloroform, add 10.6 µL of POPC at 10 mg/mL, 4 µL of POPE at 10 mg/mL, and 4.55 µL of CF-PE at 1 mg/mL. For PIP-containing liposomes, in 179 µL of chloroform, add 10.5 µL of POPC at 10 mg/mL, 4 µL of POPE at 10 mg/mL, 4.55 µL of CF-PE at 1 mg/mL, and 2 µL of PIP at 1 mM.
2. Incubate the glass tubes for 10 min at 37 °C to homogenize lipid mixtures.

3. Evaporate the solvents for 30 min under nitrogen to form a dry film.
4. Place the glass tubes in the vacuum chamber overnight to eliminate traces of solvent (*see Note 5*).
5. Resuspend the lipids in 200 μL of liposome resuspension buffer preheated at 37 °C to give 1 mM lipid suspensions.
6. Place the glass tubes for 1 h in a 37 °C water bath and apply vigorous vortexing every 10 min.
7. Subject the lipid suspensions to 5 cycles of freezing and thawing using liquid nitrogen and a 37 °C water bath. Centrifuge at $100 \times g$ for 1 min and transfer the lipid mixtures to 1.5 mL microcentrifuge tubes (*see Note 6*). After this stage, lipids can be stored at -80 °C for up to 1 month.
8. Thaw the lipid suspensions and sonicate for 60 min in a water bath sonicator filled with ice. The lipid suspension should be clear; otherwise, sonicate for a few more minutes.

Using this protocol, liposomes are around 50 nm in diameters (as measured by dynamic light scattering). Liposomes can be kept for 2–3 days at 4 °C, protected from light (*see Note 7*).

3.2 Liposome Flotation

1. In thickwall polycarbonate tubes, mix 1–10 μg of the recombinant protein of interest with 20 μL of each liposome mixture in a final volume of 100 μL of PBS (w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) (this corresponds to a 5 μM concentration of exposed PIPs) (*see Note 8*).
2. After a 20 min incubation at room temperature, add 100 μL of 60% sucrose in PBS to yield a 30% final sucrose concentration. Mix gently to have a homogeneous solution.
3. Overlay with 250 μL of 25% sucrose and 50 μL of PBS (w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) on top without disturbing the layers (*see Note 9*).
4. Centrifuge at $200,000 \times g$ for 1 h at 20 °C. During centrifugation, the fluorescent liposomes migrate to the top buffer layer.
5. Using a portable UV lamp, check the presence of the liposomes on the top buffer layer and collect the fractions from bottom to top using a Hamilton syringe. Fractions volume: bottom 200 μL , middle 200 μL , and top 100 μL .
6. Analyze 20–30 μL of each fraction by SDS-PAGE followed by western blot analysis or Coomassie staining.

3.3 Protein–Lipid Interaction by Fluorescence (PLIF)

1. Thaw your GST-tag recombinant proteins of interest (keep on ice) and place your liposomes on the bench protected from the light (using aluminum foil, for example) (*see Note 10*).

2. Fill three reagent reservoirs for multichannel pipette with 50 mL of PBS (w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$), liposome-binding buffer, and liposome lysis buffer (room temperature).
3. Remove the number of strips required from glutathione-coated plate and place in strip holder. One 8-well strip is necessary to test one recombinant protein with each liposome (control, PtdIns3P, PtdIns4P, PtdIns5P, PtdIns(3,4) P_2 , PtdIns(3,5) P_2 , PtdIns(4,5) P_2 , PtdIns(3,4,5) P_3). Return remaining strips to storage.
4. Add 200 μL of PBS (w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) in each well using a multichannel pipette and incubate for 2 min on an orbital microplate shaker, 300 rpm. Remove all solutions from the wells with a vigorous flick of the plate and series of pats onto paper towels (5–7 hard pats). Repeat the washes twice.
5. In each well, in a 100 μL final volume of liposome-binding buffer, add 1 μg of GST-tag recombinant protein diluted in liposome-binding buffer and 5 μL of fluorescent PIP-containing liposomes (this corresponds to a 250 nM concentration of exposed PIPs) and incubate on an orbital microplate shaker at 300 rpm for 20 min (*see Note 11*).
6. Flick out the solutions from the wells and wash once with 200 μL of liposome-binding buffer using the multichannel pipette. Remove all solutions from the wells with a vigorous flick of the plate and series of pats onto paper towels (5–7 hard pats).
7. Add 100 μL of liposome lysis buffer using a multichannel pipette and incubate on an orbital microplate shaker for 5 min at 300 rpm.
8. Transfer 100 μL from each well in a new *white* 96-well microtiter plate using a multichannel pipette. Avoid making bubbles, which may alter the fluorescence measurement. The transfer in a new white plate is necessary because well strips are transparent and not usable for fluorescence reading.
9. Read the fluorescence with a fluorescence plate reader for the 96-well microtiter plate (λ_{ex} , 485; λ_{em} , 518 nm) and plot the results with the name of each PIP on abscissa axis and the fluorescence on the ordinate axis (*see Note 12*).

4 Notes

1. Hydration of lipids is an important step for liposomes formation. Thus, it is important to use phospholipids with low transition temperatures (T_c or T_m) such as POPC and POPE. Other phospholipids can also be included in liposome

composition such as POPS and cholesterol and with different ratios to mimic specific cellular compartment, for example.

2. Phospholipids in organic solution should be stored in a glass container layered with nitrogen. Saturate the atmosphere with nitrogen each time you open a tube to avoid lipid oxidation and wrap with parafilm.
3. Other buffers than PBS can be used such as HEPES-buffered saline. This is important for low-affinity interactions for which the phosphate present in PBS can act as a competitor for PIP binding. Protein-phosphoinositide interaction can also be dependent on the pH mainly through protonation of histidine residues.
4. It is very important that your recombinant protein of interest is well dialyzed to eliminate the reduced glutathione used to elute your protein during the purification steps. This is because the PLIF assay involves the interaction of proteins with glutathione-coated wells.
5. It is very important to eliminate all solvent traces using the vacuum chamber because solvent can interfere with liposome formation.
6. Liposome formation by sonication is much more efficient in microcentrifuge tubes than glass tubes.
7. As an alternative, liposomes can be formed using an extruder to produce liposomes of different sizes.
9. The use of gel-loading tips for this task can be very helpful.
10. As for liposome flotation, the use of positive controls (for example, GST-FYVE (HRS), which interacts with PtdIns3P; GST-PH (PLC δ 1), which interacts with PtdIns(4,5)P₂; and GST-PH (GRP1), which interacts with PtdIns(3,4,5)P₃) is highly recommended.
11. By doing the experiment with increasing concentration of liposomes, one can have access to relative affinity determination. Fluorescence values obtained for each concentration and for each PIP tested are then plotted and fitted using one-site binding (hyperbola) to obtain affinity values [5].
12. If no fluorescence signal was obtained whereas your positive control gave expected results, this can be due to low affinity of your protein for PIP. In this case, you can increase the

concentration of liposomes in your experiments to increase the concentration of exposed PIPs or increase the percentage of PIPs in your liposomes to increase the concentration range. If high background signal is obtained, this is due to an inefficient wash.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Inserm, Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20170336737), E-Rare (TREAT-MTMs), and AFM-Téléthon (#20879 to K.H.). M.P. is a recipient of a PhD fellowship from AFM-Téléthon (#22115). B.P. is a scholar of the Institut Universitaire de France.

References

1. Viaud J, Mansour R, Antkowiak A et al (2016) Phosphoinositides: important lipids in the coordination of cell dynamics. *Biochimie* 125:250–258. <http://sci-hub.tw/10.1016/j.biochi.2015.09.005>
2. Dowler S, Kular G, Alessi DR (2002) Protein lipid overlay assay. *Sci STKE* 2002(129):pl6. <http://sci-hub.tw/10.1126/stke.2002.129.pl6>
3. Narayan K, Lemmon MA (2006) Determining selectivity of phosphoinositide-binding domains. *Methods* 39(2):122–133. <http://sci-hub.tw/10.1016/j.ymeth.2006.05.006>
4. Bigay J, Antony B (2005) Real-time assays for the assembly-disassembly cycle of COP coats on liposomes of defined size. *Methods Enzymol* 404:95–107. [http://sci-hub.tw/10.1016/S0076-6879\(05\)04010-3](http://sci-hub.tw/10.1016/S0076-6879(05)04010-3)
5. Ceccato L, Chicanne G, Nahoum V et al (2016) PLIF: a rapid, accurate method to detect and quantitatively assess protein-lipid interactions. *Sci Signal* 9(421):rs2. <http://sci-hub.tw/10.1126/scisignal.aad4337>

ARTICLE 2

(Soumission PNAS)

A phosphoinositide conversion mechanism controls mammalian myoblast fusion

Mélanie Mansat¹, Gaëtan Chicanne¹, Mélanie Picot¹, Bernard Payrastra^{1,2}, Karim Hnia¹ & Julien Viaud¹✉

¹INSERM U1297 and University of Toulouse 3, Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases (I2MC), Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 04, France.

²CHU (Centre Hospitalier Universitaire) de Toulouse, Laboratoire d'Hématologie, 31059 Toulouse Cedex 03, France.

✉email: julien.viaud@inserm.fr, ORCID: 0000-0003-4406-5642

Abstract

Myogenesis is a multistep process that requires a spatiotemporal regulation of cell events resulting finally in myoblast fusion into multinuclear myotubes. Most major insights into the mechanisms underlying fusion seem to be conserved from insects to mammals, and include the formation of podosome-like protrusions that exert a driving force toward the founder cell. However, the machinery that governs this process remains poorly understood. In this study, we identified a phosphoinositide conversion mechanism that regulates myoblast fusion. We demonstrate that MTM1 is the main enzyme responsible for the production of phosphatidylinositol 5-phosphate, which in turn fuels PI5P 4-kinase α to produce a minor and functional pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate that concentrates in PLPs containing the scaffolding protein Tks5, Dynamin-2, and the fusogenic protein Myomaker. Collectively, our data reveal a functional crosstalk between a PI-phosphatase and a PI-kinase in the regulation of PLP formation with direct implication for X-linked myotubular myopathy.

Significance

Myoblast fusion into multinuclear myotubes is a critical cellular process for the formation of skeletal muscle fibres. However, the mechanisms that coordinate cell fusion remain incompletely understood. In the present study, using a cellular model of X-linked centronuclear myopathy, in which the phosphoinositide phosphatase MTM1 has been knockout, we unravel an unexpected pathway linking MTM1 to cell-cell fusion. We show that MTM1 is the main enzyme in this cell system that synthesizes PI5P, that is rapidly metabolized by the PI5P 4-kinase α into PI(4,5)P₂ that accumulates at the plasma membrane of podosome-like protrusion to promote a spatiotemporal regulation of myoblast fusion.

Introduction

Phosphoinositides (PIs) are a minor class of phospholipids that play an essential role in diverse cellular functions highlighted by the direct involvement of their metabolizing enzymes in human pathologies (1, 2). However, there is still limited knowledge of the functions of low abundant PIs such as phosphatidylinositol 5-phosphate (PI5P) or phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P₂), the least characterized species (3). MTM1 is a lipid phosphatase that *in vivo* dephosphorylates phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) into PI (4-6) and possibly PI(3,5)P₂ into PI5P (7). Mutations in the myotubularin 1 (*MTM1*) gene are responsible for X-linked myotubular myopathy (XLMTM), the most severe form of centronuclear myopathy (CNM), which results in most cases from the lack of MTM1 (8). Interestingly, while MTM1 is ubiquitously expressed, only skeletal muscle is affected in XLMTM, suggesting the intervention of tissue-specific interactors/signaling pathways to mediate the impact of MTM1 on the disease. An *Mtm1* knockout mouse model has been developed and it reproduces the human pathology (9). Data from studies on other animal models, like *Drosophila* and *Zebrafish*, support the muscular function of MTM1 in PI3P-dependent membrane/vesicular trafficking and the homeostasis of the endosomal system to regulate t-tubule organization, organelle positioning, excitation-contraction coupling, and cytoskeletal organization (10-12). However, our current knowledge about the role of MTM1 substrates and products during myogenesis is undefined as well as their roles in the etiology of the disease.

Results

MTM1 is required for normal myoblast differentiation

In order to gain insight into the function of MTM1, its importance in PI5P production from PI(3,5)P₂, and the role of these lipids in the etiology of the disease, we used the C2C12 mouse myoblast cell line that is widely used to study myogenesis *in vitro* and that rapidly differentiates into myotubes under low-serum conditions (13-15). We succeeded to isolate an *Mtm1* KO cell line that has retained its myotube formation capacity, using clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)–CRISPR-associated protein 9 (Cas9) technology *via* the ribonucleoprotein editing strategy. In KO cells, the presence of frameshift mutations leading to premature stop codons in the *Mtm1* gene was identified by allelic sequencing (*SI Appendix*, Fig. S1 A and B) and confirmed by the absence of MTM1 on western blot; in parental WT cells, MTM1 expression normally increases steadily during differentiation (Fig. 1 A). No indel mutations were observed in predictive off-targets (*SI Appendix*, Fig. S1 C).

We next differentiated parental WT and KO cells for 10 days and assessed myotube formation (myosin heavy chain (MHC)-positive cells). As shown in Fig. 1 B, myogenic differentiation in WT cells is visually apparent after 3 days, with aligned and elongated myotubes at day 6 that continue to grow until day 10. In contrast, in KO cells there is a clear delay in differentiation with formation of shorter non-spindle shaped myotubes visible at day 6, with continued growth until day 10 but with adhesion defects on the gelatin substratum, a phenotype already described in animal models (10, 16). Interestingly, we recently reported that valproic acid ameliorates the differentiation process and adhesion of our *Mtm1*-KO cells as in zebrafish and mouse XLMTM models (17). Importantly, knock down of MTM1 with shRNAs resulted in the same phenotypes as KO cells (*SI Appendix*, Fig. S1 E-G). Accordingly, average area of myotubes from KO cells was found reduced by ~50% at all stages of the differentiation process (Fig. 1 C), with fusion indexes (percentage of nuclei in MHC-positive cells) in WT and KO cells of $11 \pm 0.97\%$ and $1.78 \pm 0.19\%$ after 3 days of differentiation, respectively (Fig. 1 D). Fusion indexes were comparable at day 6, with a decrease in KO cells at day 10 that can be explained by myotube detachment from the substrate. Whereas nuclei were found well aligned in WT myotubes (Fig. 1 B, zoom a), nuclei were found mislocalized in KO myotubes (Fig. 1 B, zoom

b, Fig. 1 G), a phenotype reminiscent of the human XLMTM pathology. Moreover, quantification of alignment of myotubes, obtained by calculating the angle of deviation of myotubes from the principal axis (for more details, see the Methods section), identified the non-alignment of myotubes as a phenotype of *Mtm1* KO (Fig. 1 B and E). To confirm that the defects in differentiation were a specific consequence of the loss of MTM1 rather than a nonspecific effect of CRISPR/Cas9 mutagenesis, we transduced KO cells with a lentivirus encoding flag-MTM1 and then allowed the cells to differentiate. Re-expression of MTM1 rescued the differentiation process, with formation of well-structured and aligned myotubes (Fig. 1 F and E), a rescue in nuclei positioning (Fig. 1 G), and an increase in the fusion index (Fig. 1 H). On the contrary, re-expression of a catalytic-dead version of MTM1 (flag-MTM1-CS) failed to rescue the normal differentiation process (Fig. 1 E and H-J), highlighting the crucial role of the enzymatic function of MTM1 in myogenesis. All of these results validate the *Mtm1*-KO cell line as a cellular model and position MTM1 as a critical enzyme in myoblast differentiation as recently reported (18).

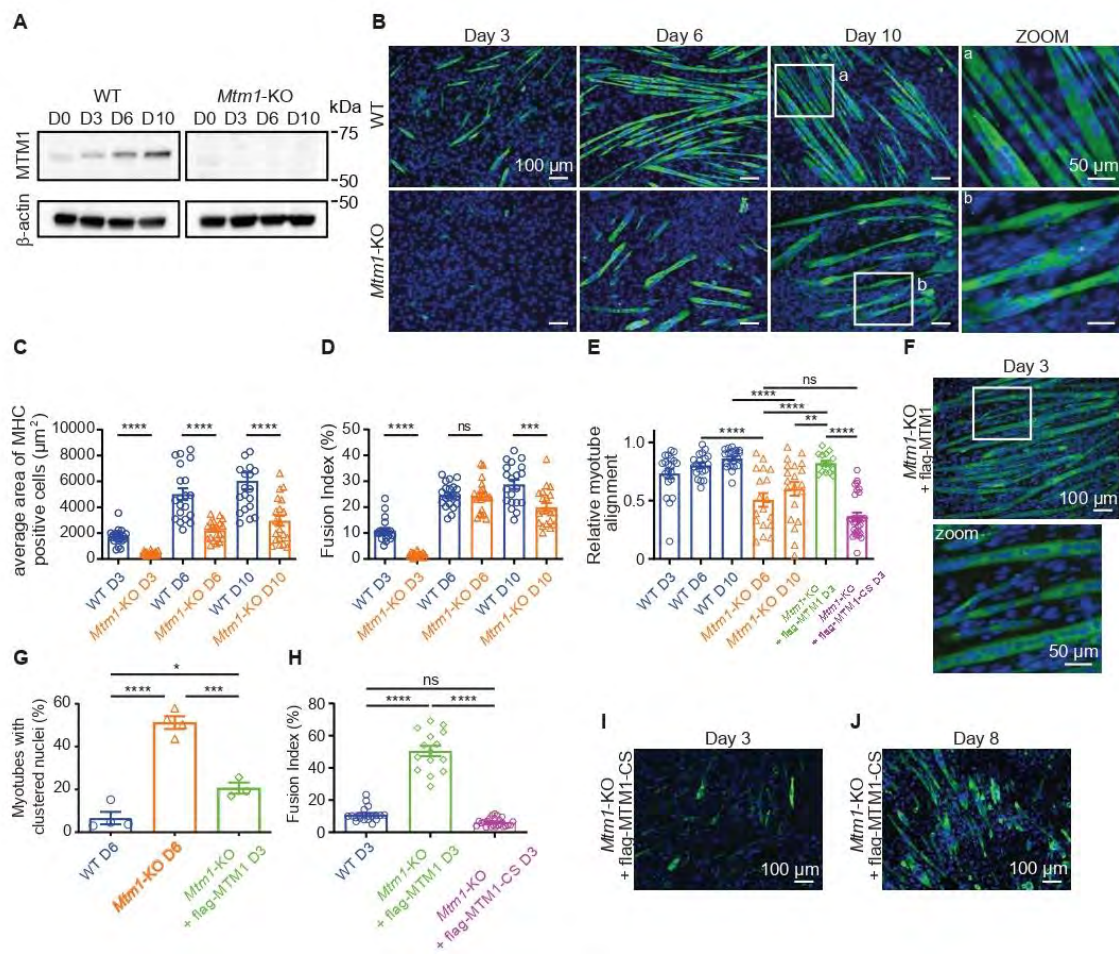


Fig. 1. Phenotypic characterization of the *Mtm1* knockout cell line. (A) Expression of MTM1 at the indicated time points of WT and *Mtm1*-KO C2C12 differentiation analyzed by Western blot. Images are representative of 6 independent experiments. (B) MHC and DAPI staining of C2C12 WT and *Mtm1*-KO at the indicated time points. Scale bar, 100 μm . On the right, higher magnifications for the indicated areas shown as boxes. Scale bar, 50 μm . C Average area of MHC labeled WT and *Mtm1*-KO cells during differentiation. Data are represented as mean \pm S.E.M, n=4, 5 fields per independent experiment, each point represents one field of view, ****p<0.0001 according to Mann-Whitney test. (D) Quantification of the fusion index for the WT and *Mtm1*-KO cells at the indicated time points. The fusion index represents the number of nuclei in MHC positive cells compared to the total number of nuclei. Data are represented as mean \pm S.E.M, n=4, 5 fields per independent experiment, each point represents one field of view, ns=not significant, ***p<0.001 and ****p<0.0001 according to Mann-Whitney test. (E) Relative myotube alignment from C2C12 WT, *Mtm1*-KO, *Mtm1*-KO expressing flag-MTM1 or flag-MTM1-CS for the indicated days of differentiation. Data are represented as mean \pm S.E.M, n=3-4, 5 fields per independent experiment, each point represents one field of view, ns=not significant, **p<0.01 ****p<0.0001 according to one-way ANOVA test and Šídák's multiple comparisons test. (F) MHC and DAPI staining of C2C12 *Mtm1*-KO expressing flag-MTM1 after 3 days of differentiation. Scale bar, 100 μm . The lower panels represent a higher magnification for the indicated area shown as a box. Scale bar, 50 μm . (G) Percentage of myotubes with clustered nuclei (myotube presenting more than 5 grouped nuclei) for the indicated days of differentiation of C2C12 WT, *Mtm1*-KO and *Mtm1*-KO expressing flag-MTM1. Data are represented as mean \pm S.E.M, n=3-4, *p<0.05, ***p<0.001 and ****p<0.0001 according to one-way ANOVA test and Šídák's multiple comparisons test. (H) Quantification of the fusion index for the indicated days of differentiation of C2C12 WT, *Mtm1*-KO expressing flag-MTM1 or flag-MTM1-CS. Data are represented as mean \pm S.E.M, n=3-4, 5 fields per independent experiment, each point represents one field of view, ns=not significant, ****p<0.0001 according to one-way ANOVA test and Šídák's multiple comparisons test. (I) MHC and DAPI staining of C2C12 *Mtm1*-KO expressing flag-MTM1-CS after 3 days of differentiation. Scale bar, 100 μm . J MHC and DAPI staining of C2C12 *Mtm1*-KO expressing flag-MTM1-CS after 8 days of differentiation. Scale bar, 100 μm .

PI5P level is dependent on MTM1 activity in muscle cells and unexpectedly decreases during myoblast differentiation

To evaluate the impact of *Mtm1* KO on PIs metabolism, we quantified PIs during C2C12 differentiation by metabolically labeling cells with [³²P] Phosphate. PI3P levels remained stable during WT cells differentiation whereas it accumulates in KO myotubes (Fig. 2 A-C), similar to what has been observed in muscle tissues from *Mtm1* KO animal models (6, 11). Regarding the other *in vitro* substrate of MTM1, PI(3,5)P₂, we measured an increase in its level by ~1.5 fold in KO myotubes (Fig. 2 D), suggesting for the first time that PI(3,5)P₂ is metabolized by endogenous MTM1 in skeletal muscle cells. There was no effect on PI(3,4)P₂ levels, an MTM1-unrelated phosphoinositide (Fig. 2 E). Because PI5P, the product of PI(3,5)P₂ hydrolysis by MTM1, cannot be quantified by metabolic labeling, we used a specific radioactive mass assay. We measured a decrease of its level by ~40% in myoblasts and ~70% in myotubes from *Mtm1*-KO cells (Fig. 2 F) indicating that MTM1 is the major source for PI5P synthesis in this cell system. Unexpectedly, in WT cells, we measured a ~50% decrease in PI5P level during differentiation (Fig. 2 F), whereas an increase proportional to MTM1 expression was expected (Fig. 1 A). This result suggests that PI5P could be metabolized when cell differentiation is induced.

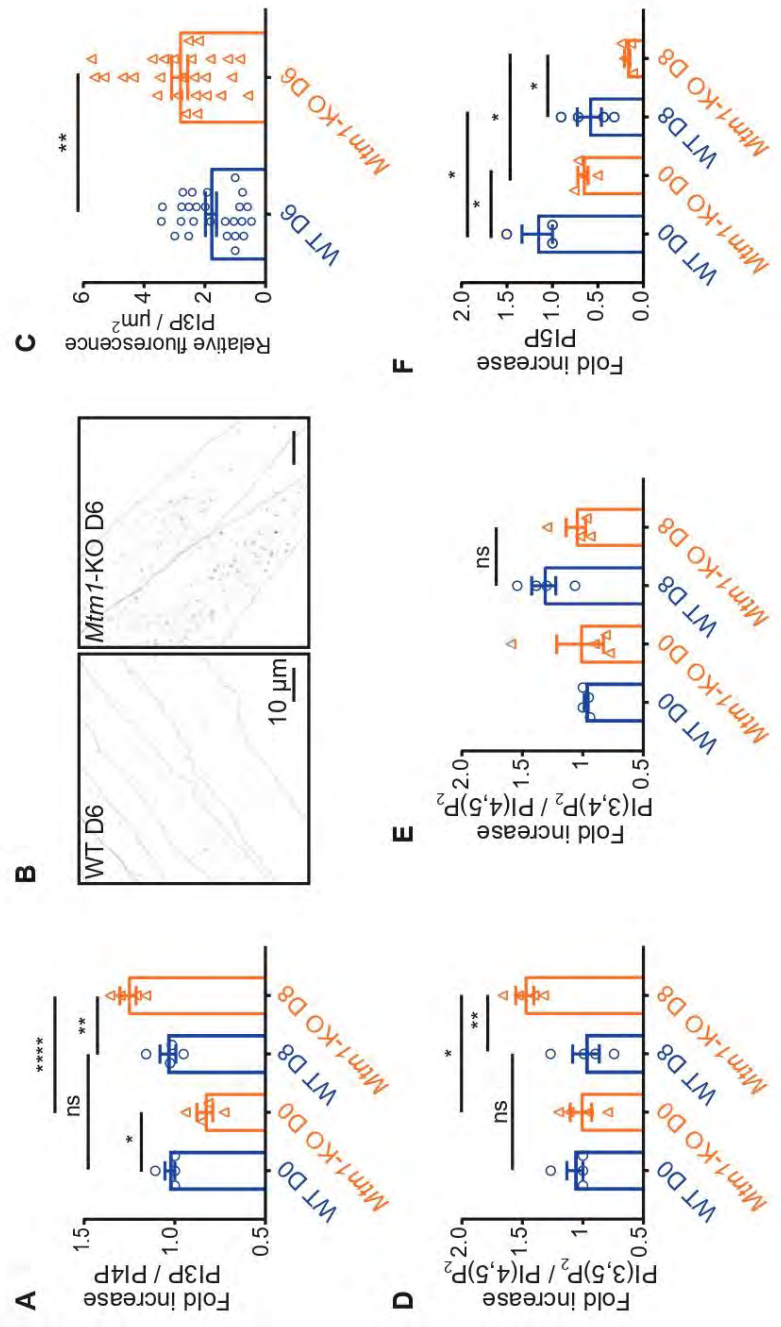


Fig. 2. PI5P is mainly produced by MTM1 in skeletal muscle cells and is rapidly metabolized. (A) PI3P quantification in C2C12 WT and *Mtm1*-KO cells at the indicated days of differentiation quantified by HPLC following ^{32}P metabolic labeling. Results are expressed as the fold increase compared to the level measured in WT C2C12 at day 0. Data are represented as mean \pm S.E.M, n=4, ns=not significant, *p<0.05, **p<0.01 and ****p<0.0001 according to one-way ANOVA test and Šídák's multiple comparisons test. (B) Representative images of PI3P labeling (FYVE^{HRS} probe) of C2C12 WT and *Mtm1*-KO myotubes at day 6 of differentiation. Cell contours are represented as dashed lines. Scale bar, 10 μm . (C) Quantification of the experiment described in (B). Data are represented as mean \pm S.E.M, n=3, each point represents one field of view, **p<0.01 according to Student's t-test. (D) PI(3,5)P₂ quantification as in (A). Data are represented as mean \pm S.E.M, n=4, ns=not significant, *p<0.05 and **p<0.01 according to one-way ANOVA test and Šídák's multiple comparisons test. (E) PI(3,4)P₂ quantification as in (A). Data are represented as mean \pm S.E.M, n=4, ns=not significant according to one-way ANOVA test and Šídák's multiple comparisons test. (F) PI5P quantification by mass assay in C2C12 WT and *Mtm1*-KO cells at the indicated days of differentiation. Data are represented as mean \pm S.E.M, n=4, *p<0.05 according to one-way ANOVA test and Šídák's multiple comparisons test.

PI(4,5)P₂ is enriched in podosome-like protrusions containing Tks5, Dynamin-2 and Myomaker.

The only metabolic conversion mechanism of PI5P known so far is mediated by PI5P 4-kinases (PI5P4Ks) to generate a minor pool of PI(4,5)P₂, the major source being generated from PI4P by PI4P 5-kinases (19). However, it is largely accepted that their function would be to control PI5P levels in the cell (20). Interestingly, PI(4,5)P₂ was shown to be locally enriched at the fusion site of *Drosophila* myoblast (21) in structures called podosome-like protrusions (PLPs), demonstrated to drive myoblast fusion by exerting an invasive force toward the opposing founder cell (22). Importantly, PLPs are essential to bring the cell membranes even closer together than the adhesion machinery, and would be required to coordinate the action of cell fusogens (23-25). In this model, PI(4,5)P₂ enrichment at the fusion site is thought to regulate fusion through the localization of activators of actin polymerization (21), which is consistent with the role of PI(4,5)P₂ as a central regulator of actin cytoskeleton dynamics (26). More recently, those structures have been described to drive mammalian myoblast fusion (27). Remarkably, this study showed that the podosome scaffolding proteins Tks5 (28) and Dynamin-2 (29) are also markers of those structures and are required for mammalian myoblast fusion. Immunofluorescence experiments on WT cells differentiated for 3 days revealed the presence of PI(4,5)P₂ decorating all the plasma membrane with PI(4,5)P₂-enriched structures resembling PLPs (*SI Appendix*, Fig. S2 A) (27). By using a fluorescent recombinant probe for PI(4,5)P₂ (e.g. the PH domain from phospholipase C δ 1, PLC δ 1) (30), we confirmed PI(4,5)P₂ enrichment in those structures where α -actin accumulates (Fig. 3 A and B). Co-localization with Tks5 confirmed that these structures are indeed PLPs, that we observed between adjacent cells (Fig. 3 C and D) and at the tip of cells (Fig. 3 E and F) as reported previously (27), and that we also found enriched with Dynamin-2 and Myosin Heavy Chain IIb (MyHC-IIb) (Fig. 3 G and H, *SI Appendix*, Fig. S2 B and C). Moreover, we showed that they do not correspond to transient blebbing occurring before cell death (*SI Appendix*, Supplementary Fig. 2D). Time-lapse microscopy

of WT C2C12 cells expressing Tks5-GFP allowed us to observe the dynamic of those structures that resemble to the labeling observed on the fixed cells (Movie S1). However, excitation illumination blocked cell fusion in the imaged field areas. Given that the fusogenic protein Myomaker has been described to actively participate in the membrane fusion reaction by initiating the fusion pore formation (31), it was tempting to speculate a correlation between PLPs and the fusion factor that has been shown recently to converge to the invasive protrusions of *Zebrafish* myoblast to initiate myoblast fusion (24). We thus co-labeled Myomaker with an antibody that we first validated (*SI Appendix*, Fig. S2 E and F) together with PI(4,5)P₂ and found a strong enrichment of Myomaker at the plasma membrane enriched with PI(4,5)P₂ (Fig. 3 I and J), reinforcing the importance of PLPs for mammalian myoblast fusion. Importantly, quantification of PLPs indicated a decrease in their number during C2C12 differentiation in agreement with their role in myoblast fusion and a defect in their formation in the absence of MTM1 (Fig. 3 K). Moreover, co-labeling of PI(4,5)P₂ together with cadherin as a plasma membrane marker showed that membrane folding does not account for the excess PI(4,5)P₂ staining in PLPs (Fig. 3 L).

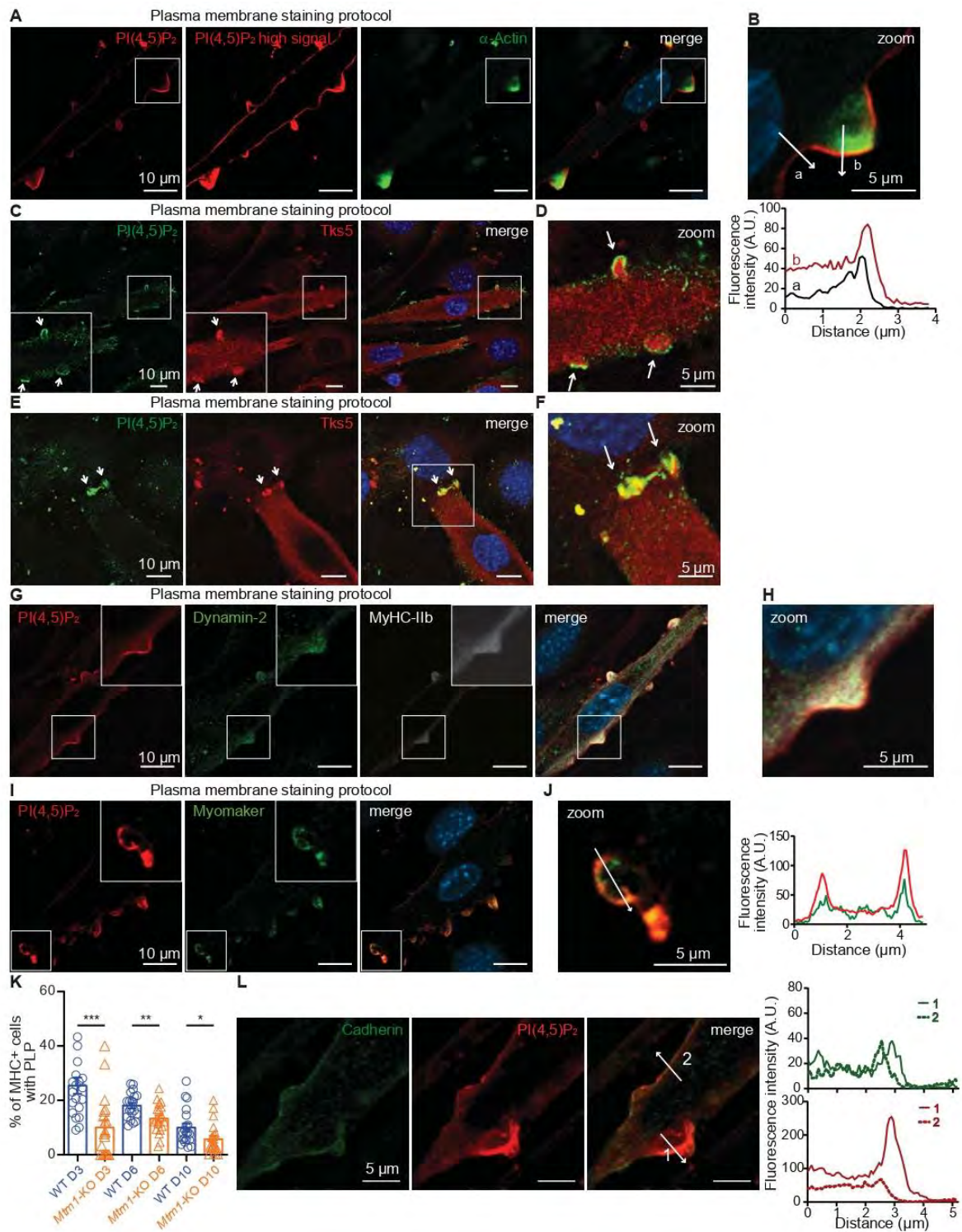


Fig. 3. PI(4,5)P₂ is highly enriched in podosome-like protrusions. (A) Representative confocal images of C2C12 WT after 3 days of differentiation and labeled with a PI(4,5)P₂ probe (PH domain of PLCδ1), α-actin and DAPI. Scale bar, 10 μm. (B) Magnification of the boxed area shown on the left. Respective line scans are shown below the zoom panel. Scale bar, 5 μm. (C and E) Representative confocal images of C2C12 WT at day 3 of differentiation labeled with a PI(4,5)P₂ antibody and for Tks5 and DAPI. Arrows indicate podosome-like protrusions. Scale bar, 10 μm. (D and F) Magnification of the boxed area shown in C, E. Arrows indicate podosome-like protrusions. Scale bar, 5 μm. (G) Representative confocal images of C2C12 WT after 3 days of differentiation labeled with a PI(4,5)P₂ probe and for Dynamin-2, Myosin Heavy Chain IIb (MyHC-IIb) and DAPI. Scale bar, 10 μm. H Magnification of the boxed area shown on the left. Scale bar, 5 μm. (I) Representative confocal images of C2C12 WT after 3 days of differentiation and labeled with a PI(4,5)P₂ probe, Myomaker and DAPI. Scale bar, 10 μm. (J) Magnification of the boxed areas shown on the left. A line scan is shown on the right. (K) Quantification of podosome-like protrusions in WT and *Mtm1*-KO myosin heavy chain (MHC)-positive cells at the indicated time points of differentiation. Data are represented as mean ± S.E.M, n=4, 5 fields per independent experiment, each point represents one field of view, ns=not significant, *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 according to unpaired t-test. (L) Representative confocal images of C2C12 WT after 3 days of differentiation and labeled for Cadherin and with a PI(4,5)P₂ probe. Respective line scans are shown on the right. Scale bar, 10 μm.

PI5P4K α and γ are enriched in podosome-like protrusions

We next tested whether PI(4,5)P₂ enrichment was dependent on PI5P4K activity. This family encompasses 3 genes in mammals: *PIP4K2A*, *PIP4K2B*, and *PIP4K2C* that encode the enzymes PI5P4K α , PI5P4K β , and PI5P4K γ , respectively, with very different *in vitro* PI5P 4-kinase activities. PI5P4K α is at least 100 fold more active than PI5P4K β and 1000 fold more active than PI5P4K γ (32). However, recent data in *Drosophila* suggest that all mammalian PI5P4K isoforms have *in vivo* lipid-kinase activity since the phenotype observed in the absence of the sole *Drosophila* PI5P4K can be compensated by each mammalian isoform (33). Moreover, individual PI5P4Ks have been shown to localize in different cellular compartments and to homo and hetero-dimerize (34). Notably, PI5P4K β , localized in the nucleus through a nuclear localization sequence (34), has been shown to hetero-dimerize with PI5P4K α and drive the complex to the nucleus, with the majority of PI5P4K activity coming from PI5P4K α (35). Concerning PI5P4K α and PI5P4K γ , they have been shown to hetero-dimerize *in vitro* (32) and to localize mainly in the cytosol including the Golgi and undefined endomembrane compartments (34). These findings lead to the hypothesis that a primary function of the two less active isoforms may be to target the active PI5P4K α to different locations and/or to regulate its activity. We thus focused on PI5P4K α and PI5P4K γ and immunoblot analysis revealed that they are expressed gradually during C2C12 differentiation, suggesting an active role of those proteins in myogenesis and/or muscular functions (Fig. 4 A). No abnormality in PI5P4Ks expression was observed in *Mtm1*-KO cells as compared to WT cells (*SI Appendix*, Fig. S3 A). To test their potential role in the fusion process, we over-expressed these lipid-kinases in C2C12 myoblasts and allowed the cells to differentiate for 3 days. Over-expression of eGFP-PI5P4K α or eGFP-PI5P4K γ accelerated the fusion process, with the formation of eGFP positive cells containing more nuclei than with the eGFP control; this increase was even more pronounced for cells with a high-efficient transfection, suggesting an active role of the kinases in the fusion process (Fig. 4B and C). Then, we localized endogenous PI5P4Ks using antibodies that we first validated by over-expressing the 3 different PI5P4K isoforms in HEK293 cells and verifying that the PI5P4K antibodies didn't cross-react (*SI Appendix*, Fig. S3 B-D). PI5P4K α and PI5P4K γ were found to localize as cytoplasmic puncta that accumulate in MyHC-IIb-enriched PLPs (Fig. 4D and E). Particularly, PI5P4K α was found

strongly enriched in all MyHC-IIb-positive PLPs whereas PI5P4K γ was found only slightly enriched in structured PLPs (Fig. 4 D-F), reinforcing the hypothesis that PI5P4Ks, and most probably PI5P4K α , could be responsible for the production of this localized pool of PI(4,5)P $_2$ from PI5P. Immunofluorescence of PI(4,5)P $_2$ -enriched PLPs confirmed those observations, with PI5P4K α found enriched in all PLPs, and PI5P4K γ mainly enriched in the more structured PLPs (Fig. 4G and H). In contrast, PI5P4K β localized homogeneously as cytosolic puncta (*SI Appendix*, Fig. 3E and F).

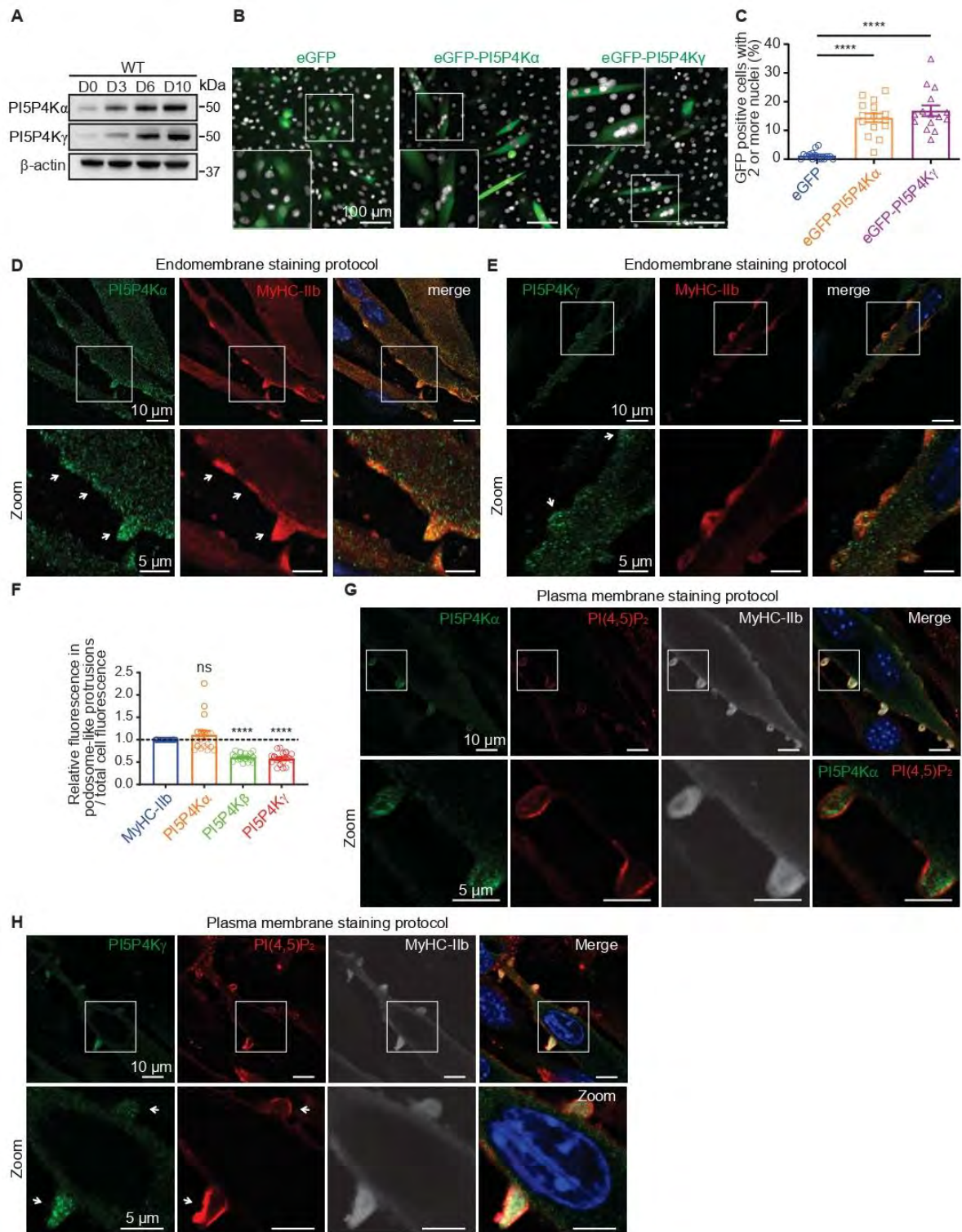


Fig. 4. PI5P4K α and γ accelerate myoblast fusion and localize to PI(4,5)P₂-enriched podosome-like protrusions. (A) Expression of PI5P4K α and PI5P4K γ during WT C2C12 differentiation analyzed by Western blot. Images are representative of 3 independent experiments. (B) Representative images of C2C12 WT cells expressing GFP, GFP-PI5P4K α or γ after 3 days of differentiation and labeled for DAPI. Scale bar, 100 μ m. (C) Quantification of the GFP-positive cells with two or more nuclei from the experiment described in (B). Data are represented as mean \pm S.E.M, n=3, 5 fields per independent experiment, each point represents one field of view, ****p<0.0001 according to one-way ANOVA test and Šídák's multiple comparisons test. (D) Top: Representative confocal images of C2C12 WT after 3 days of differentiation and labeled for PI5P4K α , MyHC-IIb and DAPI. Scale bar, 10 μ m. Bottom: higher magnifications of areas shown as boxes on the top. The arrows show the strong enrichment of PI5P4K α in MyHC-IIb-positive PLPs. Scale bar, 5 μ m. (E) Top: Representative confocal images of C2C12 WT after 3 days of differentiation and labeled for PI5P4K γ , MyHC-IIb and DAPI. Scale bar, 10 μ m. Bottom: higher magnifications of areas shown as boxes on the top. The arrows indicate the enrichment of PI5P4K γ in structured MyHC-IIb-positive PLPs. Scale bar, 5 μ m. (F) Quantification of relative fluorescence of the indicated proteins in podosome-like protrusions using MyHC-IIb as a podosome-like protrusions marker. Data are represented as mean \pm S.E.M, n=3, each point represents one field of view, ****p<0.0001 according to One-sample t-test (two tailed). (G) Top: Representative confocal images of C2C12 WT after 3 days of differentiation and labeled for PI5P4K α , PI(4,5)P₂ (PH domain of PLC δ 1), MyHC-IIb and DAPI. Scale bar, 10 μ m. Bottom: higher magnifications of areas shown as boxes on the top. Scale bar, 5 μ m. (H) Top: Representative confocal images of C2C12 WT at D3 of differentiation labeled for PI5P4K γ , PI(4,5)P₂ (PH domain of PLC δ 1), MyHC-IIb, and DAPI. Scale bar, 10 μ m. Bottom: magnifications of areas shown as boxes on the top. The bottom arrow shows the strong enrichment of PI5P4K γ in structured PI(4,5)P₂-positive PLPs and the top arrow the absence of PI5P4K γ enrichment in less structured PLPs. Scale bar, 5 μ m.

PI5P4K α is essential for myoblast fusion and is responsible for PI5P conversion into PI(4,5)P₂

These results prompted us to knock-down either *Pip4k2a* or *Pip4k2c* in C2C12 cells using lentiviruses expressing shRNA. Efficient knock-down was obtained with *Pip4k2a* shRNA #1 and #2 (81% and 92.7% of protein extinction, respectively) whereas the shRNA #3 resulted in a modest extinction (35.8% of extinction) (Fig. 5 A, *SI Appendix*, Fig. S4 A). Knockdown of *Pip4k2a* with shRNAs #1 and #2 results in a strong defect of myoblast fusion, with fusion indexes of $8.74 \pm 1.08\%$ and $8.74 \pm 0.86\%$ after 6 days of differentiation compared to a fusion index of $25.03 \pm 2.24\%$ with the control shRNA (Fig. 5 B and C). Concerning *Pip4k2a* shRNA #3, myoblast fusion was unmodified, suggesting that high levels of knockdown are necessary to inhibit the fusion process. Re-expression of PI5P4K α with a shRNA-resistant expressing lentivirus rescued the fusion process (fusion index of $16.07 \pm 0.92\%$) (Fig. 5 B and C), thus confirming that this phenotype is specifically due to *Pip4k2a* knockdown. Importantly, Re-expression of a kinase dead version of PI5P4K α failed to rescue the fusion process (fusion index of $10.61 \pm 1.12\%$), indicating that its catalytic activity is essential (Fig. 5 B and C). Concerning PI5P4K γ , robust knockdown was obtained with *Pip4k2c* shRNAs #1 and #2 (64.6% and 92.3% of protein extinction, respectively) (Fig. 5 A, *SI Appendix*, Fig. S4 B) which also resulted in inhibition of myoblast fusion (fusion indexes of $7.93 \pm 1.09\%$ and $6.30 \pm 0.56\%$ respectively) (Fig. 5 B and C), despite the fact that PI5P4K γ displays only very low activity *in vitro* (32). Re-expression of PI5P4K γ rescued the fusion defect (fusion index of $20.34 \pm 0.97\%$) (Fig. 5 B and C), validating the observed phenotype. Re-expression of a kinase dead version of PI5P4K γ also rescued the phenotype (fusion index of $26.31 \pm 2.12\%$) indicating that PI5P4K γ likely operates as a scaffolding protein (Fig. 5 B and C). In order to demonstrate that PI5P4Ks are responsible for the transformation of PI5P produced from MTM1 into PI(4,5)P₂, we measured PI5P levels in 6-days differentiated WT cells depleted for either PI5P4K α or PI5P4K γ . A ~5 fold increase in PI5P levels was observed when *Pip4k2a* was knocked down (as compared to control cells), whereas a ~2 fold increase was observed when PI5P4K γ was knocked down, showing that PI5P4K α is responsible for the conversion of a large amount of PI5P into PI(4,5)P₂ (Fig. 5 D). Importantly, PIP₂ levels were unchanged, showing that PI5P4K α and γ are responsible for the synthesis of a quantitatively minor pool of PI(4,5)P₂ (Fig. 5 E). In contrast, knock down of *Pip4k2a* or *Pip4k2c* in *Mtm1*-KO C2C12 cells (*SI Appendix*, Fig. S4 C-F) had no effect on PI5P levels, demonstrating that the pool of PI5P produced by MTM1 is metabolized into PI(4,5)P₂ mainly by PI5P4K α (Fig. 5 D). In accordance with

the importance of their catalytic activity in the myoblast fusion process, knock-down of *Pip4k2a* but not *Pip4k2c*, decrease the number of PLPs in myoblast after 3 days of differentiation (Fig. 5 F). To go further with the role of PIPs metabolized by MTM1, we inhibited PIKfyve, the alleged source of PI(3,5)P₂, using Apilimod. Treatment of WT and *Mtm1*-KO C2C12 resulted in the decrease of the fusion indexes (Fig. 5 G), likely explained by an excessive cytoplasmic vacuolation, cytotoxicity and cell detachment as already reported (Fig. 5 H) (36).

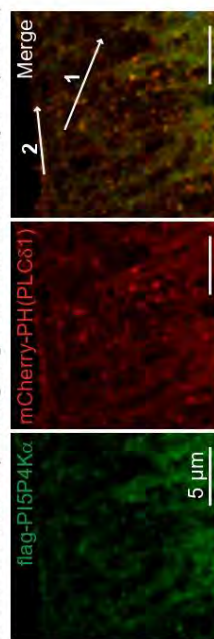
Fig. 5. PI5P4K α is responsible for the conversion of PI5P produced by MTM1 into a minor PI(4,5)P₂ pool essential for myoblast fusion. (A) Expression of PI5P4K α and PI5P4K γ at day 3 of differentiation of C2C12 expressing control shRNA, *Pip4k2a* shRNAs or *Pip4k2c* shRNAs analyzed by Western blot. (B) MHC and DAPI staining of differentiated C2C12 cells expressing control shRNA, *Pip4k2a* shRNAs, *Pip4k2c* shRNAs and re-expressing or not a shRNA-resistant PI5P4K. Scale bar, 100 μ m. (C) Quantification of the fusion index of the experiment described in (B). Data are represented as mean \pm S.E.M, n=3, 5 fields per independent experiment, each point represents one field of view, ns=not significant, ***p<0.001, ****p<0.0001 according to one-way ANOVA test and Šídák's multiple comparisons test. (D) PI5P quantification by mass assay of 6 days differentiated WT and *Mtm1*-KO C2C12 cells expressing control shRNA, *Pip4k2a* shRNA #2 or *Pip4k2c* shRNA #2. Data are represented as mean \pm S.E.M, n=4, ns=not significant, **p<0.01 according to one-way ANOVA test and Šídák's multiple comparisons test. (E) PIP₂ quantification by mass spectrometry of 6 days differentiated C2C12 cells expressing control shRNA, *Pip4k2a* shRNA #2 or *Pip4k2c* shRNA #2. Data are represented as mean \pm S.E.M, n=4, no statistical significance, according to one-way ANOVA test and Šídák's multiple comparisons test. (F) Quantification of podosome-like protrusions in myosin heavy chain (MHC)-positive cells at day 3 of differentiation. Data are represented as mean \pm S.E.M, n=4, 5 fields per independent experiment, each point represents one field of view, ns=not significant, ****p<0.0001 according to one-way ANOVA test and Šídák's multiple comparisons test. (G) Quantification of the fusion index for the WT and *Mtm1*-KO cells treated or not with apilimod during 3 days. The fusion index represents the number of nuclei in MHC positive cells compared to the total number of nuclei. Data are represented as mean \pm S.E.M, n=3, 5 fields per independent experiment, each point represents one field of view, ns=not significant, *p<0.05, **p<0.01 and ****p<0.0001 according to Mann-Whitney test. (H) MHC and DAPI staining of differentiated C2C12 cells treated or not with apilimod during 3 days. Scale bar, 100 μ m.

PI5P is likely converted into PI(4,5)P₂ by PI5P4K α on cytosolic vesicles

Because there is currently no specific probe to visualize endogenous PI5P, we reasoned that overexpressing PI5P4K α together with a PI(4,5)P₂ probe would define the production site of PI5P. We thus co-overexpressed flag-PI5P4K α and mCherry-PH (PLC δ 1), or expressed mCherry-PH (PLC δ 1) alone, in WT C2C12 cells. As one would expect and already reported, blocking PI(4,5)P₂ accessibility with a PI(4,5)P₂ probe inhibits myoblast fusion (not shown) (21, 37). In addition to the expected labeling of PI(4,5)P₂ at the plasma membrane, we observed the labeling of cytosolic vesicles that were also found enriched at the plasma membrane when flag-PI5P4K α was overexpressed (Fig. 6 A and B). These PI(4,5)P₂-rich vesicles, for which we have not succeeded in determining the origin, co-localized with flag-PI5P4K α (Fig. 6 A), suggesting that PI5P is transformed by PI5P4K α on vesicles near the plasma membrane to drive PLP formation. Interestingly, PI5P4K α partially co-localized with flag-MTM1 on vesicles that accumulate also near the plasma membrane (Fig. 6 C), reinforcing the hypothesis that PI(3,5)P₂ would be transformed by MTM1 into PI5P on vesicles and would then be converted into PI(4,5)P₂ by PI5P4K α to reach the plasma membrane and drive PLPs formation.

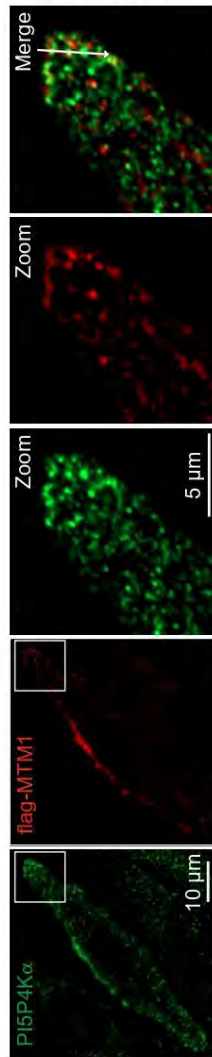
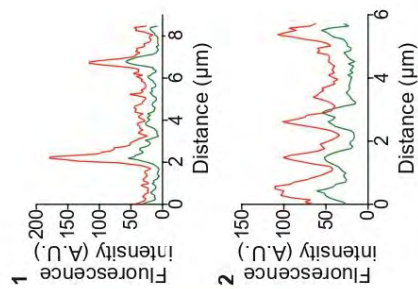
A

C2C12 WT over-expressing flag-PI5P4K α and mCherry-PH (PLC δ 1)

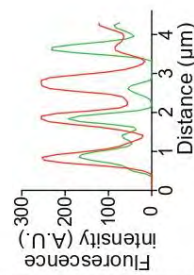


B

C2C12 WT over-expressing mCherry-PH (PLC δ 1)



C



D

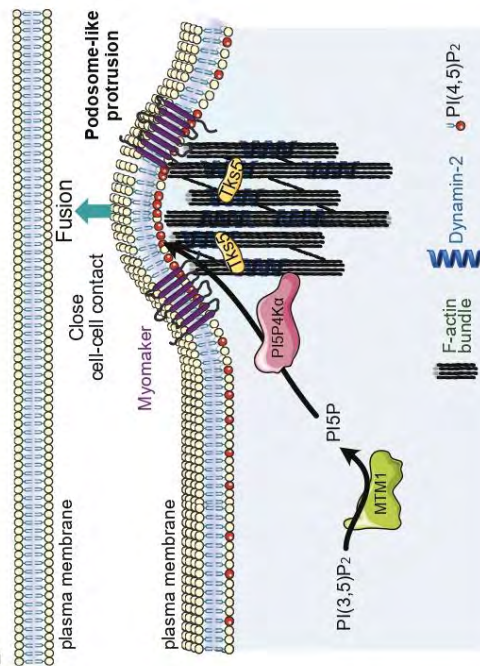


Fig. 6. MTM1 and PI5P4K α colocalize on cytosolic vesicles to produce and convert PI5P into PI(4,5)P₂. (A) Representative confocal images of C2C12 WT cells over-expressing flag-PI5P4K α and mCherry-PH (PLC δ 1) and labeled for flag and DAPI. Scale bar, 5 μ m. Respective line scans are shown on the right. (B) Representative confocal images of C2C12 WT cells over-expressing mCherry-PH (PLC δ 1) and labeled for DAPI. Scale bar, 5 μ m. (C) Representative confocal image of C2C12 WT cells over-expressing flag-MTM1 and labeled for flag and PI5P4K α . Scale bar, 10 μ m. Higher magnifications of the boxed area shown on the right. Scale bar, 5 μ m. A line scan is shown on the right. (D) Hypothetical model for the production of PI(4,5)P₂ in podosome-like protrusions *via* MTM1 through PI5P4K α .

Discussion

Our results reported here identify PI5P4K α/γ , members of the lipid kinases family implicated in metabolism, immune function and growth control (20), as important regulators of myoblast fusion. We show, by biochemical experiments combined with studies in genome-engineered cells, that MTM1 is a master enzyme for the production of PI5P from PI(3,5)P₂ in skeletal muscle cells, highlighting an unconsidered role of PI(3,5)P₂ and PI5P compared to PI3P in the pathogenesis of XLMTM. Moreover, we uncover a direct role of MTM1 activity in the early phase of myogenesis, showing that MTM1 may participate in different regulatory mechanisms during myogenesis as compared to its function in mature skeletal muscle (38). We reveal an unexpected mechanism whereby PI5P is rapidly transformed into PI(4,5)P₂ by PI5P4K α to drive PI(4,5)P₂ accumulation in PLPs where it localizes with α -actin, Tks5 and Dynamin-2, the molecular markers of PLPs (27), as well as the fusogen Myomaker. This allows the generation of a localized area of close cell-cell contact to create a favorable environment for membranes to fuse (Fig. 6 D). Therefore, the pathway unraveled here identifies PI5P4K α as responsible for the synthesis of a functional pool of PI(4,5)P₂, as also shown in B cells (39), while most of previous studies suspected that it mainly controls PI5P levels (20). Concerning PI5P4K γ , we found it accumulating only in mature PLPs, where it could play a role by regulating PI5P4K α activity through a scaffolding role (32). Given that knockdown of

Pip4k2a blocks myoblast fusion, our data favor a model in which PI(4,5)P₂ accumulation is essential for PLP formation and membrane fusion likely through the recruitment of the actin polymerization machinery and associated proteins that will also participate to maintain PI(4,5)P₂ enrichment in PLPs. In line with this model, knockdown of the *Zebrafish* PI5P4K α has been shown to lead to severe morphological abnormalities features, most likely due to defects in midbody curvature, which are largely dependent on structurally and functionally intact muscles (40). However, mouse knockout for PI5P4K α (41) or PI5P4K γ (42) appear normal in regard to growth and viability. Nevertheless, it is conceivable that most tissues can compensate developmental events when there is deletion of a single isoform of PI5P4K as suggested by the facts that phenotypes are only observed or worsen when multiple isoforms are targeted (41) and that compensation of the *Drosophila* PI5P4K deletion phenotype is observed with any of the three mammalian PI5P4K isoforms (33). Finally, because we didn't succeed to identify the vesicular compartments where PI5P is produced by MTM1 and transformed into PI(4,5)P₂ by PI5P4K α , further investigations are needed to understand the origin of the different actors implicated in this molecular pathway. With better tools being made available, such as a specific PI5P probe and MTM1 antibodies working on immunofluorescence, we hope to answer precisely these questions to understand the spatiotemporal regulation of MTM1 functions particularly during PLP formation.

Taken together, we identified a phosphoinositide conversion mechanism relying on MTM1 and PI5P4K α that produces a functional pool of PI(4,5)P₂ accumulating in PLPs and crucial for the proper regulation of myoblast fusion. These results provide a key missing link in understanding how muscle cells fuse and may be of particular importance in the etiology of XLMTM, a severe human skeletal muscle disease due to *MTM1* loss of function.

Materials and Methods

Antibodies and Reagents

Antibodies used in this study are listed in *SI Appendix*, Table S1. Main Reagents used in this study are listed in *SI Appendix*, Table S3.

Plasmids

pMJ915 used for recombinant Cas9 purification was a gift from Jennifer Doudna (University of California, Berkeley/HHMI). N174-MCS (puromycin) was a gift from Adam Karpf (Addgene plasmid # 81068; <http://n2t.net/addgene:81068>; RRID:Addgene_81068), N174-MCS (neomycin) was a gift from Adam Karpf (Addgene plasmid # 81061; <http://n2t.net/addgene:81061> ; RRID:Addgene_81061). peGFP-C1 was from Clontech. peGFP-PIP4K2A, peGFP-PIP4K2B and peGFP-PIP4K2C were a gift from Jonathan Clarke (Uni. Of Cambridge). The pBabe-X-SF1-myomaker plasmid was a gift from Douglas Millay (Cincinnati Children's Hospital Medical Center). N174(puro)-flag-MTM1, N174(puro)-flag-MTM1-CS, N174(neo)-Flag-PIP4K2A and N174(neo)-Flag-PIP4K2C were constructed using the plasmids and primers described in Supplementary Table 2 using In-fusion kit (Takara Bio) according to the manufacturer's instructions. N174(neo)-Flag-PIP4K2A-sh2-resist and N174(neo)-Flag-PIP4K2C-sh2-resist were constructed using the plasmids and primers described in *SI Appendix*, Table S2 and the mutagenesis protocol of the In-fusion kit (Takara Bio) according to the manufacturer's instructions. pGEX-2TK-PH (PLC δ 1) and pGEX-2TK-FYVE (HRS) were a gift from Mark Lemmon (Yale, U.S.A). PH (PLC δ 1) and FYVE (HRS) were first subcloned into pmCherry-C1 (Clontech) using the restriction enzymes and primers listed in Supplementary Table 2 then subcloned into pGEX-4T-1 (Pharmacia Biotech) using the restriction enzymes and primers listed in *SI Appendix*, Table S2. shRNAs constructs: Mouse *Mtm1* (Stock: TRCN0000080723 (*Mtm1* shRNA #1), TRCN0000080727 (*Mtm1* shRNA #1)), *Pip4k2a* (Stock: TRCN0000415033 (*Pip4k2a* shRNA #1), TRCN0000025576 (*Pip4k2a* shRNA #2), TRCN0000425695 (*Pip4k2a* shRNA #3)), *Pip4k2c* (Stock: TRCN0000024701 (*Pip4k2c* shRNA #1),

TRCN0000024702 (*Pip4k2c* shRNA #2)) TRC shRNA were from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). SHC003 (Sigma-Aldrich) was used as a control.

CRISPR-Mediated Genome Editing in C2C12 Cells

The webtool CRISPOR (43) was used to design gRNAs targeting *MTM1* based on their specificity score. Low-passage C2C12 cells were electroporated with Cas9-sgRNA RNP targeting *MTM1* exon 8 using the Neon transfection system (Life Technologies). 12.5 pmol of recombinant Cas9 purified as described (44) were incubated with 75 pmol of sgRNA synthesized using the EnGen sgRNA Synthesis Kit (New England Biolabs) from the template oligonucleotide described in Supplementary Table 2 and purified with the RNA clean & concentrator-25 kit (Zymo research). The complex was incubated 10 minutes at room temperature. 100,000 cells were mixed with the RNP and electroporated using the following conditions: 1,650V, 10 ms, 3 pulses and then placed in a well of a twelve-well plate containing 500 μ l growth medium without antibiotics. 24 hours after electroporation, cells were detached using accutase (BD biosciences) and half was used to monitor genomic editing efficiency and half was sorted as single cell into 96-well plates using FACS. Briefly, for genomic editing efficiency, genomic DNA was isolated using the GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) and was used as template to amplify by a nested PCR (primers described in Supplementary Table 2), a 638-bp region surrounding the predicted site of Cas9 activity using PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara Bio). Genomic editing efficiency verification was done using a T7 endonuclease assay according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs). After single cell sorting, each clone was amplified and genotyped by amplifying the 638-bp region described previously and analyzed with the TIDE webtool (Tracking of Indels by Decomposition) (45) to identify clones with frameshift mutations (TIDE results for the isolated clone used in this study presented in *SI Appendix*, Fig. S1 A). Identified clones were further assessed for their capacity of differentiation. The isolated clone used in this study was further characterized by sequencing predictive off-targets provided by CRISPOR (amplified with primers described in Supplementary Table 2 and results presented in *SI Appendix*, Fig. 1 C); and bacterial single colony sequencing of modified alleles (amplified using the primers listed in *SI Appendix*, Table S2 from the

genomic DNA and subcloned in a pcDNA3.1(+) vector using the In-fusion kit (Takara Bio). Frameshift mutations are presented in *SI Appendix*, Fig. S1 B.

Cell culture and electroporation

C2C12 mouse myoblasts (ECACC 91031101) were maintained at low density in DMEM-glutamax without pyruvate (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum and differentiated in DMEM-glutamax without pyruvate supplemented with 2% horse serum when cells reached 90-95% confluency. Briefly, cells were seeded at 8,000 cells/cm² with or without glass coverslips coated with 0.2% gelatin. Two days after, cells were switched to differentiation medium and culture media was changed every day. Electroporations were performed using the Neon transfection system (Life Technologies). Briefly, 240,000 C2C12 cells were mixed with plasmid DNA in a final volume of 12 μ l and 10 μ l were electroporated using the following conditions: 1,650 V, 10 ms, 3 pulses. Cells were then placed in a well of a twelve-well plate containing 1 ml growth medium without antibiotics. 20 minutes after, antibiotics were added and cell differentiation was started the following day as described previously. Cells were routinely tested for *Mycoplasma* contamination and all tests were negative.

Lentivirus production and transduction

Vector particles were produced as previously described (46). C2C12 cells were transduced by incubation with lentiviral particles and then washed 48 h later with growth medium in the presence of 2 μ g.ml⁻¹ puromycin supplemented with 1 mg.ml⁻¹ G418 for rescue experiment with shRNA resistant gene. When cells reached 90-95% confluency, differentiations were started as previously described in the presence of 1 μ g.ml⁻¹ puromycin supplemented with 500 μ g.ml⁻¹ G418 for rescue experiment with shRNA resistant genes.

Western Blotting

Total cellular proteins were extracted with Cell Lysis Buffer (Cell Signaling) and 20 μ g proteins were separated by electrophoresis on 4-12% gradient SDS-polyacrylamide gel (Life Technologies) and

transferred on Immobilon-P membranes (Millipore). Membranes were then incubated with appropriate antibodies (references, dilutions, buffer and incubation times are available in *S/ Appendix*, Table S1) and immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories) with clarity Western ECL substrate detection system (Bio-Rad Laboratories). Full length original western blots for these results are provided in Supplementary material.

Protein purification and protein labeling

Recombinant GST-mCherry-PH-domain (PLC δ 1) and GST-mCherry-FYVE-domain (HRS) were expressed in BL21(DE3) bacteria overnight at 18°C using 0.5 mM IPTG and purified by affinity chromatography using Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. GST-mCherry-PH-domain (PLC δ 1) / GST-mCherry-FYVE-domain (HRS) were purified in 50 mM Tris at pH 8.0, 100 mM NaCl, 10% glycerol, snap-frozen and stored at -80°C.

Microscopy

For average area of MHC positive cells, fusion index, clustered nuclei and relative directionality calculations, cells were fixed with 3.7% formaldehyde for 10 minutes at room temperature, quenched with 50 mM NH₄Cl for 10 minutes and permeabilized by 0.1% Triton X-100 in DPBS during 10 minutes. After 1 hour of saturation with 10% goat serum in DPBS, cells were incubated for 1 hour with antibodies at room temperature. After incubation with fluorescent secondary antibodies (ThermoFisher), nuclei were stained with DAPI (Euromedex), and cells were washed and maintained in DPBS. Imaging was performed with the ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad Laboratories). Area and fusion index were calculated using ImageJ. Relative myotube alignment was quantified using a two-dimensional fast Fourier transform using ImageJ by following the protocol described in (47). Endomembrane staining protocol: cells were fixed with 3.7% formaldehyde, quenched with NH₄Cl for 10 minutes and permeabilized with 20 μ M Digitonin/PIPES-BS (PIPES 20 mM pH 6.8, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM) for 5 minutes. After 1 hour saturation period in 10% goat serum/PIPES-

BS, cells were incubated with 50 µg/ml of the GST-mCherry-FYVE-domain (HRS) probe and/or primary antibodies for 2 hours at room temperature. After 3 washes with PIPES-BS, secondary fluorescent antibodies in 10% goat serum/PIPES-BS were added for 1 hour, washed 3 times with PIPES-BS. Cells were then fixed a second time with 3.7% formaldehyde, nuclei were stained with DAPI, washed 3 times with DPBS, mounted with FluorSave reagent (Calbiochem). Plasma membrane staining protocol: PI(4,5)P₂ and proteins staining were done as described in (48) but with minor modifications. Briefly, all steps were performed on ice until the second fixation and with ice cold solutions. Cells were fixed with 3.7% formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde for 15 min. After three washes with NH₄Cl, cells were incubated for 1 hour in blocking buffer (PIPES-BS, NH₄Cl 50mM, Goat Serum 10%, Saponin 0.05%), then incubated for two hours with primary antibodies and the probe against PI(4,5)P₂ in antibodies buffer (PIPES-BS, Goat Serum 10%, Saponin 0.1%). After three washes with PIPES-BS for 5 min, secondary fluorescent antibodies were added in antibodies buffer for 1 hour. After a wash with PIPES-BS, cells were fixed a second time with 3.7% formaldehyde for 10 min, then 5 min room temperature. After three washes with DPBS, nuclei were stained with DAPI, washed 3 times with DPBS, and mounted with FluorSave reagent (Calbiochem). Imaging was performed with confocal LSM780 Zeiss microscope (Zen software, x63 objective) or LSM900 Zeiss microscope (Zen software, x63 objective). Fluorescence intensities were calculated with ImageJ. For time-lapse microscopy, 3 days differentiated myoblasts were imaged in gelatin-coated ibidi 35 mm glass bottom (ibidi, 81158). Images were acquired with Zeiss Cell Observer.Z1 microscope, objective Plan-Apochromat 40x/1.4 oil, camera CCD Hamamatsu Orca R2 (Model C10600-10B-H). Imaging parameters: 20% LED intensity, 600ms exposure time, every 10 minutes for 2 days.

Phospholipid extraction and analysis

Metabolic labeling: C2C12 cells were seeded on 10 cm plate and differentiated for the indicated periods. Metabolic labeling with [³²P] Phosphate (1 mCi; Perkin Elmer) was performed the day before phospholipids extraction. Phospholipids were extracted according to Bligh and Dyer procedure (49), purified by TLC (thin layer chromatography), and analyzed by high-performance liquid

chromatography (HPLC) as described in (46). Mass assay for PI5P were performed exactly as described in (50) from C2C12 cells seeded on 10 cm plate and differentiated for the indicated periods.

PIP₂ measurement by mass spectrometry

PIP₂ levels were measured from C2C12 cells cultured in 6-well plates as described in (51).

Statistics and reproducibility

All data were represented as the mean \pm S.E.M. Statistical analysis was performed as described for each experiment in the figure legends using GraphPad Prism 9. In all tests and all statistical analyzed data sets, the levels of significance were defined as: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 and ****P<0.0001. For comparisons between two experimental groups, after a normality test, data were analyzed by Mann Whitney test or unpaired t-test. For comparisons between more than two experimental groups, data were analyzed by one-way ANOVA with a post-hoc test (Šídák's multiple comparisons test). One-sample t-test was used for comparisons with control group values that had been set to 1 for normalization purposes. For each experiment, data are representative of at least three independent replications, with similar results obtained.

Acknowledgments

We thank Jennifer Doudna and Romain Rouet (University of California, Berkeley/HHMI) for sharing with us the plasmid pMJ915, their protocol for Cas9 purification and their advices. We thank Jonathan Clarke (University of Cambridge) for the gift of the PI5P4K α , β and γ antibodies and the peGFP vectors of PI5P4K α , β and γ . We thank Damien Ramel (UMR1297, Toulouse, France) for helpful discussions and Jim Dowling (Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Canada) for critical reading of the manuscript. We thank the imaging, cytometry We-Met and Metatoul - Lipidomics facilities of the INSERM U1297 and the Integrated Screening Platform of Toulouse (PICT, IBiSA, Toulouse) for providing access to their equipments. This work was initiated by a grant from AFM-Téléthon (#20186 to J. Viaud) and supported by Inserm, grants from E-Rare JTC 2017 TREAT-

MTMs (to B. Payrastre) and AFM-Téléthon (#23101 to J. Viaud and K. Hnia). M. Picot is a recipient of a PhD fellowship from AFM-Téléthon (#22115). B. Payrastre is a scholar of the Institut Universitaire de France. The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

J. Viaud, G. Chicanne and M. Mansat created and validated the *Mtm1*-KO cell line. M. Mansat performed the cell biological experiments with the help of M. Picot. M. Mansat and G. Chicanne performed the phosphoinositides quantifications. M. Mansat and J. Viaud performed the biochemical experiments. G. Chicanne, M. Mansat and J. Viaud performed the molecular biology. G. Chicanne and J. Viaud performed the production of lentiviruses. J. Viaud, M. Mansat, G. Chicanne, K. Hnia, B. Payrastre analyzed data. B. Payrastre, K. Hnia and J. Viaud acquired financial support. J. Viaud designed and supervised the study. J. Viaud wrote the manuscript with input from all authors.

Data, Materials, and Software Availability

All study data are included in the main text and *SI Appendix*.

References

1. J. Viaud *et al.*, Phosphoinositides: Important lipids in the coordination of cell dynamics. *Biochimie* **125**, 250-258 (2016).
2. Y. Posor, W. Jang, V. Haucke, Phosphoinositides as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10.1038/s41580-022-00490-x (2022).
3. J. Hasegawa, B. S. Strunk, L. S. Weisman, PI5P and PI(3,5)P2: Minor, but Essential Phosphoinositides. *Cell Struct Funct* **42**, 49-60 (2017).
4. F. Blondeau *et al.*, Myotubularin, a phosphatase deficient in myotubular myopathy, acts on phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 3-phosphate pathway. *Hum Mol Genet* **9**, 2223-2229 (2000).
5. G. S. Taylor, T. Maehama, J. E. Dixon, Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8910-8915 (2000).
6. L. Amoasii *et al.*, Myotubularin and PtdIns3P remodel the sarcoplasmic reticulum in muscle in vivo. *J Cell Sci* **126**, 1806-1819 (2013).
7. H. Tronchere *et al.*, Production of phosphatidylinositol 5-phosphate by the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**, 7304-7312 (2004).
8. H. Tasfaout, B. S. Cowling, J. Laporte, Centronuclear myopathies under attack: A plethora of therapeutic targets. *J Neuromuscul Dis* **5**, 387-406 (2018).
9. A. Buj-Bello *et al.*, 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 (2002).
10. I. Ribeiro, L. Yuan, G. Tanentzapf, J. J. Dowling, A. Kiger, Phosphoinositide regulation of integrin trafficking required for muscle attachment and maintenance. *PLoS Genet* **7**, e1001295 (2011).
11. J. J. Dowling *et al.*, Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet* **5**, e1000372 (2009).
12. L. Al-Qusairi *et al.*, T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18763-18768 (2009).
13. D. Yaffe, O. Saxel, Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**, 725-727 (1977).
14. S. Burattini *et al.*, C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *Eur J Histochem* **48**, 223-233 (2004).
15. S. M. Hindi, M. M. Tajrishi, A. Kumar, Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion. *Sci Signal* **6**, re2 (2013).
16. V. M. Lionello *et al.*, Amphiphysin 2 modulation rescues myotubular myopathy and prevents focal adhesion defects in mice. *Sci Transl Med* **11** (2019).
17. J. R. Volpatti *et al.*, X-linked myotubular myopathy is associated with epigenetic alterations and is ameliorated by HDAC inhibition. *Acta Neuropathol* 10.1007/s00401-022-02468-7 (2022).
18. P. Samso *et al.*, Antagonistic control of active surface integrins by myotubularin and phosphatidylinositol 3-kinase C2beta in a myotubular myopathy model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**, e2202236119 (2022).
19. X. Tan, N. Thapa, S. Choi, R. A. Anderson, Emerging roles of PtdIns(4,5)P2--beyond the plasma membrane. *J Cell Sci* **128**, 4047-4056 (2015).
20. P. Raghun, Emerging cell biological functions of phosphatidylinositol 5 phosphate 4 kinase. *Curr Opin Cell Biol* **71**, 15-20 (2021).
21. I. Bothe, S. Deng, M. Baylies, PI(4,5)P2 regulates myoblast fusion through Arp2/3 regulator localization at the fusion site. *Development* **141**, 2289-2301 (2014).
22. D. M. Lee, E. H. Chen, Drosophila Myoblast Fusion: Invasion and Resistance for the Ultimate Union. *Annu Rev Genet* **53**, 67-91 (2019).
23. J. M. Hernandez, B. Podbilewicz, The hallmarks of cell-cell fusion. *Development* **144**, 4481-4495 (2017).

24. Z. Luo *et al.*, The cellular architecture and molecular determinants of the zebrafish fusogenic synapse. *Dev Cell* 10.1016/j.devcel.2022.05.016 (2022).
25. D. P. Millay, Regulation of the myoblast fusion reaction for muscle development, regeneration, and adaptations. *Exp Cell Res* **415**, 113134 (2022).
26. Y. Senju, P. Lappalainen, Regulation of actin dynamics by PI(4,5)P2 in cell migration and endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **56**, 7-13 (2019).
27. M. C. Chuang *et al.*, Tks5 and Dynamin-2 enhance actin bundle rigidity in invadosomes to promote myoblast fusion. *J Cell Biol* **218**, 1670-1685 (2019).
28. G. Kudlik *et al.*, Advances in Understanding TKS4 and TKS5: Molecular Scaffolds Regulating Cellular Processes from Podosome and Invadopodium Formation to Differentiation and Tissue Homeostasis. *Int J Mol Sci* **21** (2020).
29. R. Zhang *et al.*, Dynamin regulates the dynamics and mechanical strength of the actin cytoskeleton as a multifilament actin-bundling protein. *Nat Cell Biol* 10.1038/s41556-020-0519-7 (2020).
30. M. A. Lemmon, K. M. Ferguson, R. O'Brien, P. B. Sigler, J. Schlessinger, Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10472-10476 (1995).
31. D. P. Millay *et al.*, Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* **499**, 301-305 (2013).
32. J. H. Clarke, R. F. Irvine, 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 (2013).
33. S. Mathre *et al.*, Functional analysis of the biochemical activity of mammalian phosphatidylinositol 5 phosphate 4-kinase enzymes. *Biosci Rep* **39** (2019).
34. S. J. Bulley, J. H. Clarke, A. Droubi, M. L. Giudici, R. F. Irvine, Exploring phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase function. *Adv Biol Regul* **57**, 193-202 (2015).
35. Y. Bultsma, W. J. Keune, N. Divecha, PIP4Kbeta interacts with and modulates nuclear localization of the high-activity PtdIns5P-4-kinase isoform PIP4Kalpha. *Biochem J* **430**, 223-235 (2010).
36. O. C. Ikononov, G. Altankov, D. Sbrissa, A. Shisheva, PIKfyve inhibitor cytotoxicity requires AKT suppression and excessive cytoplasmic vacuolation. *Toxicol Appl Pharmacol* **356**, 151-158 (2018).
37. A. S. Bach *et al.*, ADP-ribosylation factor 6 regulates mammalian myoblast fusion through phospholipase D1 and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signaling pathways. *Mol Biol Cell* **21**, 2412-2424 (2010).
38. R. Joubert *et al.*, Site-specific Mtm1 mutagenesis by an AAV-Cre vector reveals that myotubularin is essential in adult muscle. *Hum Mol Genet* **22**, 1856-1866 (2013).
39. S. J. Bulley *et al.*, In B cells, phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase-alpha synthesizes PI(4,5)P2 to impact mTORC2 and Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 10571-10576 (2016).
40. D. Elouarrat *et al.*, Role of phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase alpha in zebrafish development. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 1293-1301 (2013).
41. B. M. Emerling *et al.*, Depletion of a putatively druggable class of phosphatidylinositol kinases inhibits growth of p53-null tumors. *Cell* **155**, 844-857 (2013).
42. H. Shim *et al.*, Deletion of the gene *Pip4k2c*, a novel phosphatidylinositol kinase, results in hyperactivation of the immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 7596-7601 (2016).
43. M. Haeussler *et al.*, Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol* **17**, 148 (2016).
44. S. Lin, B. T. Staahl, R. K. Alla, J. A. Doudna, Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife* **3**, e04766 (2014).
45. E. K. Brinkman, T. Chen, M. Amendola, B. van Steensel, Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res* **42**, e168 (2014).
46. J. Viaud *et al.*, Phosphatidylinositol 5-phosphate regulates invasion through binding and activation of Tiam1. *Nat Commun* **5**, 4080 (2014).

47. P. Bajaj *et al.*, Patterning the differentiation of C2C12 skeletal myoblasts. *Integr Biol (Camb)* **3**, 897-909 (2011).
48. W. Elong Edimo *et al.*, SHIP2 controls plasma membrane PI(4,5)P2 thereby participating in the control of cell migration in 1321 N1 glioblastoma cells. *J Cell Sci* **129**, 1101-1114 (2016).
49. E. G. Bligh, W. J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917 (1959).
50. J. Viaud *et al.*, Mass Assays to Quantify Bioactive PtdIns3P and PtdIns5P During Autophagic Responses. *Methods Enzymol* **587**, 293-310 (2017).
51. G. Chicanne *et al.*, Profiling of Phosphoinositide Molecular Species in Resting or Activated Human or Mouse Platelets by a LC-MS Method. *Methods Mol Biol* **2251**, 39-53 (2021).

C.V

6 allée du Lieutenant Lucien Lafay
31400 Toulouse
06 88 86 48 57
melanie.picot@inserm.fr

MELANIE PICOT

FORMATION

DEPUIS OCTOBRE 2018 :

Doctorat en Biologie Santé et Biotechnologie (BSB) – Université Paul Sabatier (Toulouse III).

Spécialité Biologie Cellulaire.

2012 – 2018 :

Formation Universitaire : Université Paul Sabatier (Toulouse III).

Licence Biologie Cellulaire et Physiologique ; Master Pharmacologie

EXPÉRIENCES

DOCTORAT – INSERM UMR1297 – INSTITUT DES MALADIES METABOLIQUE ET CARDIOVASCULAIRE (I2MC), TOULOUSE, FRANCE

Depuis Octobre 2018

Equipe du Pr.Payraastre : Lipidomique et signalisation ; sous la direction du Dr.Hnia
« *Etude de la Régulation de mTORC1 par les phosphoinositides lysosomaux : voies moléculaire et implication pathologique* »

STAGE DE RECHERCHE : INSERM UMR1297 – INSTITUT DES MALADIES METABOLIQUE ET CARDIOVASCULAIRE (I2MC), TOULOUSE, FRANCE

De Décembre 2017 à Juin 2018

Equipe du Dr.Martinez : Lipoprotéine et maladies cardiovasculaire; sous la direction du Dr.Genoux
« *Etudes des fonctions vasculoprotectives des lipoprotéines de hautes densités (HDL) dans la pré-éclampsie* »

STAGE DE RECHERCHE : CHU TOULOUSE – INSTITUT FEDERATIF DE BIOLOGIE (IFB), TOULOUSE, FRANCE

De Décembre 2016 à Février 2017

Equipe du Pr Gandia : Pharmacocinétique et toxicologie ; sous la direction du Dr.Metsu
« *Exploration de la fraction libre des antirétroviraux* »

STAGE DE RECHERCHE : CNRS UMR 5169 CENTRE DE RECHERCHE SUR LA COGNITION ANIMALE (CRCA), TOULOUSE, FRANCE

D'Octobre 2015 à Décembre 2015

Equipe du Pr Giurfa
« *Test d'une molécule agoniste de la dopamine sur la modulation de la réponse aversive chez l'abeille* »

PUBLICATIONS

2017 : Clinica Chimica Acta :

Metsu, D., Lanot, T., Fraissinet, F., Picot, M., Concordet, D., Cabrol, M., ... & Gandia, P. (2017). Determination of dolutegravir's unbound fraction in human plasma using validated equilibrium dialysis and LC-MS/MS methods. *Clinica Chimica Acta*.

2021 : Methods in molecular biology :

Mansat, M., Picot, M., Chicanne, G., Nahoum, V., Gaits-Iacovoni, F., Payrastre, B., ... & Viaud, J. (2021). Liposome-Based Methods to Study Protein-Phosphoinositide Interaction. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 2251, 177-184.

2022 : (En soumission) PNAS:

Mansat, M., Chicanne, G., Picot, M., Payrastre, B., ... & Viaud, J. A phosphoinositide conversion mechanism controls mammalian myoblast fusion

2022 : (En cours d'écriture):

Picot M., Mansat M, Chicanne G, Ping L, ... & Hnia K, Lysosomal phosphoinositides shapes RAGULATOR-RagGTPase activity and muscle growth.

COMMUNICATIONS
SCIENTIFIQUE

Mars 2019 : Poster, 6^{ème} congrès international de myologie. AFM-Téléthon, Bordeaux.

«Phosphoinositide-dependant regulation of mTORC1 in skeletal muscle : Molecular insights and involvement in centronuclear myopathy » Picot M., Mansat M, Chicanne G, Morrin E, ... & Hnia K.

Octobre 2019 : Poster 44th symposium on hormones and Cell Regulation, Mont Ste Odile

« Phosphoinositide-dependent regulation of mTORC1 in skeletal muscle growth » Picot M., Mansat M, Chicanne G, ... & Hnia K.

Septembre 2022 : Poster 7^{ème} congrès international de myologie, AFM-Téléthon, Nice

« Phosphoinositide-dependant regulation of mTORC1 in skeletal muscle : molecular insights and involvement in myotubular myopathy » Picot M., Mansat M, Chicanne G, Peng L, ... & Hnia K.

Novembre 2022 : Communication orale, séminaire interne, I2MC, Toulouse

«Lysosomal phosphoinositides shapes mTORC1 activity and muscle growth » Mélanie Picot

COMMUNICATIONS
GRAND PUBLIC

DECLIC 2019 : « Qu'est ce que la recherche scientifique ? » Lycée Bellevue, Toulouse.

Nuit européenne des chercheurs 2021 : Création d'une vidéo « Le muscle à la loupe » -L'organisation du muscle squelettique et la microscopie

Nuit européenne des chercheurs 2022 : Stand : « Médi-moi-quoi » -
Thème : Les myopathies c'est quoi et comment cherche-t-on les traitements adéquates ?

AUTRES

Enseignement 2019 et 2020 : Travaux dirigés L1 Biologie cellulaire université paul Sabatier

Encadrement Etudiants : Laura Montagné (2020 : BTS 2^{ème} année) – Albane Rigal (Master 1 BioSanté) – Clémence Navelet-Noualhier (Master 2 Génétique Moléculaire et Cellulaire) – Mathilde Vaucourt (Master 2 Biologie Santé).

2019 : Membre du comité d'organisation des journées de l'école doctoral BSB

2021 : Membre et Co-fondation du Bureau PhD postdoc de l'I2MC
