

**ECOLE DOCTORALE 414 – SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

CNRS UMR 7104 – INSERM U 1258

**THÈSE** présentée par :  
**Sarah DJERROUD**

soutenue le **06 Octobre, 2020**

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

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Identification des voies moléculaires et cellulaires  
altérées dans la myopathie centronucléaire liée au  
chromosome X (XLCNM)**

**THÈSE dirigée par :**

**Mr. Le Docteur Jocelyn LAPORTE**  
**Mme. Le Docteur Valérie BIANCALANA**

Directeur de recherche INSERM, Université de Strasbourg  
Maître de conférences-praticien hospitalier,  
Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS EXTERNES:**

**Mr. Le Docteur Stéphane VASSILOPOULOS** Chargé de recherches, Institut de Myologie, Paris  
**Mr. Le Docteur Vincent GACHE** Chargé de recherches, Institut NeuroMyoGène, Lyon

**EXAMINATEUR INTERNE :**

**Mme. Le Docteur Sylvie FRIANT** Directrice de recherche CNRS, Université de Strasbourg

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mme. Le Docteur Fanny PILOT-STORCK** Professeure, Université Paris-Est



# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, le Dr **Fanny PILOT-STORCK**, le Dr **Sylvie FRIANT**, le Dr **Stéphane VASSILOPOULOS** et le Dr **Vincent GACHE**, pour avoir honoré mon invitation et pour avoir accordé du temps à l'évaluation de mon travail de thèse. Je remercie également le Dr **Sylvie FRIANT** et le Dr **Stéphane GASMAN** d'avoir pris part à mon comité de suivi de thèse et pour tous vos conseils et suggestions qui m'ont aidé à bien orienter mon projet de thèse.

Je remercie énormément et très chaleureusement **Jocelyn**, mon directeur de thèse, de m'avoir ouvert l'univers de la « MAD team ». Merci Jocelyn pour toute la confiance que tu m'as accordée durant ces trois années passées dans ton équipe. Merci pour le sens de la responsabilité que tu as fait grandir en moi, merci surtout pour ton écoute et ta disponibilité et merci pour tous les précieux échanges scientifiques toujours très enrichissants. C'était une très belle opportunité et un réel plaisir de travailler avec toi Jocelyn. Merci pour TOUT.

Merci **Valérie** d'avoir codirigé ma thèse, et merci pour tous nos échanges et surtout pour ta gentillesse.

Je remercie très chaleureusement **Anne-Sophie Nicot** d'avoir si gentiment consacré du temps à la relecture de ma thèse en un temps record. Merci Anne-Sophie pour tous tes conseils et tes suggestions et merci surtout pour ta gentillesse et pour tes encouragements.

Je remercie toutes les personnes que j'ai croisées au début de ma thèse, et qui ont grandement facilité mon intégration. Je remercie notamment **Suzie**, **Catherine** et **Vanessa** de m'avoir bien accueillie dans l'équipe. Merci **Belinda** pour tous nos échanges très intéressants.

Merci **Hichem**, mon compatriote, pour tes encouragements et pour tes conseils toujours très pertinents, tu es un magnifique exemple de réussite à suivre.

Merci **Pascal**, **Maxime**, **Alexia**, **Amandine**, **Aymen** et **Kirsley** pour tous nos échanges et pour votre bonne humeur. Merci à tous les stagiaires que j'ai croisés durant ces trois années, **Lisa**, **Laurine**, **Alison**, **Clément**, **Anne-Sophie**...et tous les autres.

Un merci particulier à **Xavière**, j'ai énormément apprécié nos échanges scientifiques toujours très intéressants.

Merci aux Quentin (s) (**Quentin G** et **Quentin C**) d'avoir ajouté de la difficulté à l'équipe, déjà qu'ils ne s'en sortaient pas avec deux Sarah (s) dans l'équipe...Je vous souhaite beaucoup de chance pour vos thèses.

Un énorme merci à **Marion**, **Charlotte** et **David**, vous avez été d'une aide précieuse durant ces derniers mois. Merci Marion pour nos échanges et pour tes messages d'encouragement tout au long de la rédaction de ma thèse.

Merci **Coralie** pour nos échanges scientifiques et pour notre aventure à Brest. Thanks a lot to **Juliana**, for your natural kindness and your shiny smiles.

Thanks to the **Raquel, Roberto & Xenia**, it was a great pleasure to share these last years with you. Thanks Raquel for your natural kindness. Roberto, je ne t'ai jamais donné la recette du houmous maintenant que j'y pense, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Xenia, thanks for the good and the funny moments that we shared together.

**Cricri**, je ne sais comment te remercier pour chaque moment passé ensemble. Je t'ai toujours dit que ton absence se faisait ressentir au labo, car tu es vraiment la source d'énergie par excellence. Tes pots et tes bouquets de fleurs, ton sourire toujours radieux, ton éternelle bonne humeur ont rendu chaque jour meilleur, merci pour toute cette chaleur que tu as su apporter à mon cœur.

**Sarah**, depuis ton arrivée dans l'équipe, j'ai senti cette force que tu appelles si bien la « DZ power » que tu dégageais et qui m'a toujours permis d'avancer main dans la main avec toi. J'ai partagé les meilleurs mais également les pires moments de ma thèse avec toi, et tu as toujours su trouver les bons mots pour me reconforter. J'ai adoré travailler avec toi, mais aussi et surtout cuisiner et partager notre culture culinaire commune. Un grand merci à toi petite Saroune.

**Evelina**, it was such a pleasure and such a great opportunity to meet you and to have you around during a big part of my thesis. Thank you so very much for all the scientific advices and all your help. Thank you also for the rich interactions that we always had, your encouragements, you were the big sister that I don't have.

**Valentina**, I really much enjoyed working with you for a big part of your project, I learned so many things with you and thanks to you. Thanks for always being helpful and for your natural kindness that made my days easier and funnier.

**Vasugi**, Thank you so very much for your English courses, this was not easy at the beginning, but little by little, and thanks to your patience, we finally managed to have real conversations in English. Thanks for the very great moments that we spent together.

Je remercie les différentes plateformes de l'IGBMC qui ont toujours fourni un travail et une aide remarquables ayant contribué à faciliter mon travail de thèse.

Je remercie énormément mes amies **Emily, Magdalène, Mélanie, Aurore, Hakima, Betul** et **Séverine** pour tous vos encouragements, votre amour et tout votre soutien avant et durant ces trois années de thèse.

J'aimerais finir par remercier tous les membres de ma petite et grande famille. Je remercie mes oncles et tantes pour vos encouragements, j'espère avoir été à la hauteur de toute la confiance que vous avez placée en moi.

Ma mamie **Ourdia**, par où commencer mamie ? Depuis que j'étais bébé, tu as toujours si bien pris soin de moi. Aujourd'hui encore, même à plusieurs milliers de kilomètres, tes paroles et tes mots doux raisonnent

toujours comme une berceuse dans mes oreilles. Cette thèse est un hommage à toi ma mamie, pour te dire un grand MERCI pour tout simplement avoir été une grand-mère hors pair.

Je dis également un grand MERCI à mon adorable belle-famille, ma belle-mère **Hdjila** et mon beau-père **Ali**, mes belles-sœurs **Lynda** et **Malika**, mon beau-frère **Ouamer** et mes petits neveux et nièces...je crois que vous avez été autant stressés par la rédaction de ma thèse que moi-même, mais vos mots d'encouragements, votre présence constamment durant toute cette période de rédaction et surtout votre amour ont toujours été d'un énorme réconfort pour moi.

Je dis également un ÉNORME merci à ma chère sœur **Lily** et à mes adorables petits frères **Juda** et **Yanis**. Merci ma petite Lily pour ton amour et tes encouragements, tu m'avais un jour rédigé un petit mot sur une carte : *«Le chemin est long, mais la balade en vaut la peine»*...je l'emporte encore avec moi et j'y trouve toujours du courage lorsque j'en ressens le besoin. Mon grand Juda, je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien indéfectible, ta patience et le courage que tu m'as toujours apportés, tu es une source d'amour inépuisable. Notre petit dernier de la famille, mon adorable petit Yanis, j'oublie parfois comme tu as grandi ! Ton amour tu me l'as apporté dès l'instant où je t'ai vu la première fois, et tu me l'apportes encore chaque jour, à ta manière, avec ton humour, tes blagues et toute ta bonne humeur. Je dis également un grand merci à **Karima** pour ta douceur et tes encouragements, et un grand merci à **Anthony** pour tes encouragements, tes 1000 questions autour de ma thèse et ta grande curiosité scientifique.

Mes parents, mon Papa **Hamid** et ma Maman **Malika**, je pense que vous vous doutez bien qu'il m'est impossible d'énumérer toutes les choses pour lesquelles je dois vous remercier, simplement parce que je vous dois absolument TOUT. Vous êtes la source inépuisable de tout mon courage, de toute ma force et de tout mon amour. Je ne vous remercierai jamais assez pour tous les sacrifices dont vous avez fait preuve afin de rendre ce jour possible, afin de donner vie à tous mes rêves d'enfance. Malgré les milliers de kilomètres qui nous séparent, vous avez toujours été présents par le cœur et par tous vos encouragements. Aujourd'hui, je vous dédie cette thèse, ce n'est qu'une façon modeste de vous dire MERCI et de vous rendre hommage, car je vous dois toute ma réussite et mon bonheur.

Je finis par remercier celui qui donne son sens à ma vie, et qui la rend plus belle, mon autre moi-même, **Idir**. Depuis la minute où j'ai mis mes pieds en France et à ce jour, tu es celui qui m'a toujours épaulée, qui a et qui continue de toujours guider mes pas vers la réussite, celui qui me borde d'un amour inconditionnel et qui m'apporte un soutien indéfectible à chaque instant de ma vie, et ce, malgré les milliers de kilomètres qui nous séparent depuis plusieurs années. On regrette parfois certains chemins ou certains choix qu'on prend dans la vie, mais ce que je ne regrette sûrement pas, c'est d'avoir croisé ta route et d'avoir choisi de poursuivre notre chemin ensemble. Merci pour TOUT, mais merci surtout d'être le plus génial des époux.

# TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABREVIATION.....	1
LISTE DES FIGURES.....	4
RÉSUMÉ.....	5
INTRODUCTION.....	11
1 Brève introduction à la biologie du muscle squelettique.....	12
2 Myopathies et myopathies congénitales.....	16
2.1 Les myopathies congénitales.....	16
2.2 Les myopathies centronucléaires.....	16
2.3 La myopathie centronucléaire liée au chromosome X (XLCNM).....	17
2.3.1 Incidence, aspects cliniques et histologiques de la XLCNM.....	17
2.3.2 Identification et caractérisation du gène impliqué : <i>MTM1</i> .....	21
2.3.3 Caractérisation de la protéine impliquée : <i>MTM1</i> .....	21
2.3.4 Fonctions cellulaires de <i>MTM1</i> .....	24
2.3.5 Les animaux modèles de la myopathie myotubulaire (XLCNM).....	25
2.4 La myopathie centronucléaire autosomique liée à <i>BIN1</i> .....	28
2.4.1 La myopathie centronucléaire autosomique récessive ( <i>ARCNM</i> ).....	28
2.4.2 Caractérisation du gène impliqué : <i>BIN1</i> .....	30
2.4.3 La myopathie centronucléaire autosomique dominante ( <i>ADCNM</i> ).....	30
2.4.4 Caractérisation de la protéine <i>BIN1</i> et fonctions associées.....	32
2.5 La myopathie centronucléaire autosomique dominante liée à <i>DNM2</i> ( <i>ADCNM</i> ).....	34
2.5.1 Caractéristiques cliniques et histologiques.....	34
2.5.2 Caractérisation du gène impliqué : <i>DNM2</i> .....	34
2.5.3 Caractérisation de la protéine <i>DNM2</i> et fonctions associées.....	36
2.6 Trois protéines, une même voie de signalisation : la voie MAD : la Myotubularine, Amphiphysine 2 et Dynamine 2.....	38
3 Les GTPases de la famille Rho.....	41
3.1 La superfamille Ras : la famille des petites GTPases.....	41
3.2 La famille des Rho-GTPases.....	43
3.2.1 Structure des Rho-GTPases.....	43

3.2.2	Le cycle GTP/GDP des Rho-GTPases.....	45
3.3	La GTPase RAC1 : son expression et sa régulation.....	45
3.3.1	L'expression de RAC1.....	47
3.3.2	La régulation de RAC1 par les GEFs TIAM .....	47
3.3.2.1	TIAM : une GEF de la famille Dbl .....	47
3.3.2.2	L'expression des GEFs TIAM .....	48
3.3.2.3	La structure protéique des GEFs TIAM.....	48
3.3.2.4	La régulation des GEFs TIAM.....	50
4	La régulation du cytosquelette par la GTPase RAC1.....	53
4.1	Le cytosquelette d'actine : expression et dynamique de l'actine .....	53
4.1.1	Expression de l'actine .....	53
4.1.2	La dynamique de l'actine : le tapis roulant « treadmilling » .....	55
4.1.3	L'organisation générale de l'actine dans la cellule : les « fibres de tension ».....	56
4.2	Les protéines associées à l'actine : ABPs .....	56
4.2.1	Les facteurs de dépolymérisation de l'actine : la famille ADF/cofiline .....	58
4.2.2	Les facteurs de nucléation de l'actine : le complexe Arp2/3.....	60
4.3	Les rôles de RAC1 dans la régulation de la dynamique de l'actine.....	62
4.3.1	Régulation des cofilines par phosphorylation/déphosphorylation.....	62
4.3.2	Régulation du complexe Arp2/3 par le complexe WAVE.....	63
5	Rôle de l'actine dans la mécanotransduction .....	66
5.1	La mécanotransduction : définition.....	66
5.2	Les adhésions focales (FAs).....	66
5.2.1	Structure des adhésions focales .....	67
5.2.1.1	Les intégrines .....	67
5.2.1.2	La paxilline.....	70
5.2.2	Rôle du cytosquelette et des FAs dans la migration cellulaire .....	71
5.3	La mécanotransduction médiée par YAP/TAZ.....	73
5.3.1	La voie Hippo .....	74
5.3.2	Rôle de l'actine dans la régulation de YAP/TAZ .....	74
5.3.3	Rôles de YAP/TAZ dans le muscle squelettique.....	76
6	Contexte et objectifs de la thèse .....	77
	RÉSULTATS.....	79

Partie 1 .....	80
Publication 1: « Amphiphysin 2 modulation rescues myotubular myopathy and prevents focal adhesion defects in mice ».....	80
Contexte de l'étude.....	80
Objectifs de l'étude.....	80
Résultats.....	80
Conclusion .....	82
Contribution.....	82
Partie 2 .....	110
Publication 2: « Defects of the TIAM-RAC1-actin pathway are a primary cause of myotubular myopathy».....	110
Contexte de l'étude .....	110
Objectifs de l'étude.....	110
Résultats.....	110
Conclusion .....	112
Contribution.....	112
DISCUSSION.....	160
1. Altération générale de la voie TIAM-RAC1-actine dans la myopathie myotubulaire.....	161
1.1. Interaction de MTM1 et TIAM1 et régulation de RAC1 à la membrane plasmique....	163
1.2. Altération de la voie TIAM-RAC-actine et défauts des adhésions focales dans la myopathie myotubulaire.....	163
1.3. Dérégulation de la mécanotransduction médiée par YAP/TAZ dans la myopathie myotubulaire.....	165
2. L'altération de la voie TIAM1-RAC comme cause primaire de la myopathie myotubulaire et potentiel mécanisme physiopathologique commun aux autres CNMs.....	166
3. TIAM1 comme potentiel gène modificateur dans la myopathie myotubulaire.....	168
4. Conclusion et perspectives.....	169
BIBLIOGRAPHIE.....	176



# LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abi1/2	ABL interactor 1/2
ADCNM	myopathie centronucléaire autosomique dominante
ADF	facteur de dissociation de l'actine
ABP	actin-binding-proteins
ARCNM	myopathie centronucléaire autosomique récessive
Arp	Actin-related- proteins
Bp	Base pairs
BSA	bovine serum albumin
cDNA	Complementary DNA
CC	domaine Coiled-Coil
CFL1	cofiline-1
CFL2	cofiline-2
CNM	myopathie centronucléaire
DH	domaine catalytique Dbl homologue
DHPR	récepteurs à dihydropyridine
DNA	Acide Désoxyribonucléique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FAs	Adhésions focales
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fetal calf serum
GAPs	GTPase Activating proteins (Protéines activatrices des GTPases)
GBD	Domaine de liaison des Rho-GTPase
GDI	Inhibiteurs de dissociation des nucléotides guanyliques
GDP	Guanosine Diphosphate
GED	GTPase effector domain
GEF	Guanine nucleotide exchange factor (facteurs d'échange des nucléotides guanyliques)
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosines Triphosphates
h	Hours (heures)
H&E	Éosine-Hématoxyline
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IRSp53	insulin receptor substrate protein 53
LATS1/2	Large Tumor Supressor 1/2

min	minutes
ml	millilitre
mM	millimolaire
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (ARN messenger)
MST1/2	Mammalian Ste20-like kinase 1/2
MTM	Myotubularine
MTM MO	Morpholino MTM
NADH-TR	nicotinamide adénine dinucléotide tetrazolium réductase
Nap1	NCK-associated protein 1
NPFs	Nucleation Promoting Factors
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDZ	domaine PSD-95/discs large/zonula occludens-1
PFA	Paraformaldehyde
PH	domaine d'homologie à pleckstrine
PHc	domaines d'homologie à Pleckstrine C-terminal
PHn	domaines d'homologie à Pleckstrine N-terminal
PH-GRAM	Pleckstrin Homology Glucosyltransférase, Rab-like GTPase Activator and Myotubularin
PI	phosphatidylinositol
PIP	phosphoinositides
PtdIns3P	phosphatidylinositol 3-phosphate
PtdIns5P	phosphatidylinositol (5)P
PtdIns(3,4)P <sub>2</sub>	phosphatidylinositol 3,4-biphosphate
PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub>	phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate
PtdIns(3,5)P <sub>2</sub>	phosphatidylinositol 3,5-biphosphate
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PTP/DSP	Protein Tyrosine Phosphatase/Dual-Specificity Phosphatase
PTP	phosphatases à tyrosines
PRD	Prolin rich domain
PX	phox
qRT-PCR	Real-time quantitative Polymerase chain reaction
RBD	domaine de liaison de Ras
RID	RAC1-Induced recruitment Domain
RNA	Ribonucleic acid
ROIs	regions of interest
RS	réticulum sarcoplasmique
RT	Room temperature (temperature ambiante)
RYR	récepteurs à la ryanodine
s	secondes
SDH	succinate déshydrogénase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
s.e.m	standard error of the mean
shRNA	Short hairpin RNA
SH3	Src homology 3
SID	SET-protein Interaction Domain

Sra1/PIR121b	specifically RAC1-associated protein1
SSH	Slingshot
STEF	Sif-Tiam1-like exchange factor
TA muscles	Tibialis Anterior muscles
TAZ	transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
TIAM	T-lymphoma invasion and metastasis
tubules-T	tubules transversaux
UBQLN2	ubiquilin-2
Voie MAD	MAD : Myotubularine 1, Amphiphysine 2 et Dynamine 2
WAVE2	WASP family Verprolin Homologous Protein
WASP	Wiscott-Aldrich-Syndrome Proteins
WH2	Wiscott- Aldrich syndrome protein-Homology-2
WRC	WAVE regulatory complexe
WWTR1	WW Domain-containing Transcription Regulator 1
XLCNM	myopathie centronucléaire liée au chromosome X (X-linked Centronuclear Myopathy)
XLMTM	myopathie myotubulaire liée au chromosome X (X-linked Myotubular Myopathy)
YAP	Yes-associated protein
μg	microgramme
μM	micromolaires

#### Gènes humains

<i>BIN1</i>	bridging integrator-1
<i>DNM2</i>	dynamain 2
<i>MTM1</i>	myotubularine 1
<i>MTMR14</i> ( <i>hJUMPY</i> )	protéine 14 liée aux myotubularines
<i>RYR1</i>	récepteur de la ryanodine du muscle squelettique
<i>SPEG</i>	Protéine kinase exprimée préférentiellement dans le muscle strié (Striated muscle preferentially expressed protein kinase)
<i>TTN</i>	titine

# LISTE DES FIGURES

Figure 1. La morphologie du muscle squelettique.....	13
Figure 2. La différenciation des myoblastes en myotubes, en culture.....	15
Figure 3. Principales caractéristiques cliniques, histologiques et structurales de la XLCNM.	19
Figure 4. Les domaines protéiques de MTM1 et son activité de phosphatase à phosphoinositides.....	22
Figure 5. Le modèle murin de la myopathie myotubulaire: Mtm1-/y.....	26
Figure 6. Caractéristiques histologiques et structurales des muscles de patients atteints de l'ARCNM liée à BIN1.....	29
Figure 7. Caractéristiques histologiques et structurales des muscles de patients atteints de l'ADCNM liée à BIN1.....	31
Figure 8. Les différentes isoformes et les domaines protéiques de BIN1.....	33
Figure 9. Caractéristiques histologiques et structurales des muscles de patients atteints de l'ADCNM liée à DNM2.....	35
Figure 10. Représentation schématiques des différents domaines protéiques de DNM2.	37
Figure 11. Représentation schématique du rôle des protéines MTM1, BIN1 et DNM2 dans le remodelage membranaire et CNMs associées.....	39
Figure 12. Dendrogramme de la famille des petites GTPases de la superfamille Ras.....	42
Figure 13. Structure générale du domaine « G » de la famille des Rho-GTPases.....	44
Figure 14. Cycle de régulation des Rho-GTPases.....	46
Figure 15. Les domaines protéiques de TIAM1 et TIAM2.....	49
Figure 16. La polymérisation de l'actine.....	54
Figure 17. Modèle hypothétique des différents types de fibres de tension.....	57
Figure 18. L'activité de la cofiline.....	59
Figure 19. Structure du complexe Arp2/3 et son rôle dans la nucléation de nouveaux filaments d'actine.....	61
Figure 20. Le processus de polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine.....	65
Figure 21. Structure des adhésions focales.....	68
Figure 22. Rôle de l'actine et des adhésions focales dans la migration cellulaire.....	72
Figure 23. Figure 23. Modèle de régulation de YAP/TAZ par la voie Hippo.....	75
Figure 24. Représentation schématique de la voie TIAM-RAC1-actine dans le muscle sain et dans la myopathie myotubulaire : hypothèse d'un mécanisme cellulaire pathologique.....	171

Note : Les figures de la partie 1 et 2 des résultats ne font pas partie de la liste des figures car elles sont incorporées dans les manuscrits.

# RÉSUMÉ

Les myopathies congénitales regroupent un ensemble de désordres musculaires d'origine génétique. Leur incidence est estimée à 1 sur 25.000 naissances par an et elles représentent 14% des cas d'hypotonie néonatales. Les myopathies centronucléaires (CNMs) constituent un sous-groupe hétérogène de myopathies congénitales très invalidantes. Elles sont caractérisées cliniquement par une faiblesse musculaire généralisée affectant essentiellement les muscles respiratoires et bulbaires, entraînant ainsi des insuffisances respiratoires aiguës. Du point de vue histologie, les CNMs sont caractérisées par la présence de noyaux centraux en absence de régénération musculaire, alors qu'ils sont normalement localisés en périphérie des fibres musculaires. Les fibres musculaires des patients sont de taille très petite et ont une forme anormalement ronde avec un élargissement de l'espace entre les différentes fibres. Il n'existe à ce jour aucune thérapie spécifique pour les CNMs et les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces maladies sont loin d'être complètement élucidés.

La classification des CNMs est basée sur leur mode de transmission génétique ainsi que sur les gènes mutés. La plus sévère de CNMs est la forme liée au chromosome X (XLCNM). Celle-ci est due aux mutations du gène codant pour la myotubularine (MTM1). Il existe d'autres formes de CNMs, associées à des formes moins graves et dont la transmission est dite autosomique. L'une d'elles est liée à des mutations sur le gène codant pour la protéine bridging integrator 1 (BIN1). Les protéines MTM1 et BIN1 sont connues pour leurs rôles dans la régulation du trafic et le remodelage des membranes cellulaires. La protéine MTM1 est une phosphatase de lipides membranaires. Elle déphosphoryle le phosphate D3 de l'anneau inositol de deux types de phosphoinositides (PIP) : le phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) et le phosphatidylinositol 3,5-biphosphate (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>). Les phosphoinositides jouent le rôle de seconds messagers, transmettant ainsi des signaux intracellulaires en réponse à des stimuli externes. BIN1 est quant à elle capable de détecter les courbures membranaires et de les stabiliser grâce au domaine BAR.

On sait à ce jour que BIN1 et MTM1 interagissent dans les modèles cellulaires. En revanche, les mécanismes par lesquels ces protéines réguleraient les fonctions cellulaires dans le muscle squelettique restent à élucider. L'identification des mécanismes par lesquels ces protéines régulent l'homéostasie des cellules musculaires, comme la régulation du trafic membranaire et le positionnement des organites, contribuerait à la compréhension de la physiopathologie des CNMs.

La mise en évidence d'une ou plusieurs voies communes altérées dans les différentes formes de CNMs constituerait un pas de géant vers l'identification d'une cible thérapeutique commune.

L'objectif de mon projet de thèse était d'identifier la voie ou les voies moléculaires et cellulaires altérées dans les CNMs, qui sont à l'origine des défauts caractéristiques de ces myopathies, notamment les défauts de localisation nucléaire, la forme anormalement ronde et la petite taille des fibres musculaires. Je me suis essentiellement focalisée sur la myopathie myotubulaire liée au chromosome X (XLCNM). J'ai principalement travaillé sur le modèle murin de cette myopathie : *Mtm1*<sup>-y</sup> dans lequel l'expression du gène MTM1 est abolie. Ces souris reproduisent fidèlement les phénotypes observés chez les patients. Elles sont notamment caractérisées par une atrophie et une faiblesse musculaire apparaissant à environs deux semaines évoluant vers un phénotype sévère entraînant la létalité des souris vers sept semaines. Du point de vue histologique, elles ont des fibres musculaires de petite taille, rondes avec un élargissement de l'espace entre les fibres musculaires, et un positionnement des noyaux au centre des fibres musculaires.

Afin d'identifier les voies moléculaires altérées dans les CNMs, j'ai analysé des données de transcriptome et d'interactome. L'analyse des données préliminaires d'interactome m'a permis d'identifier TIAM, de la famille des GEFs (facteurs d'échange de nucléotides guanyliques) interagissant avec MTM1. Les résultats de transcriptome dans les muscles squelettiques (tibia antérieur : TA) des souris *Mtm1*<sup>-y</sup> ont révélé des défauts d'expression des protéines TIAM, avec une surexpression de TIAM2 et une sous-expression de TIAM1, à deux semaines (phase pré-symptomatique) et à sept semaines (phénotype sévère). Ces données ont été confirmées par qPCR et par Western Blot.

Les protéines TIAM (TIAM1 et TIAM2) sont des GEFs de la famille Dbl (Diffuse B-cell Lymphoma). Ces protéines GEFs régulent les réactions d'échange du GDP en GTP de RAC1, une petite Rho-GTPase de la superfamille Ras, permettant de l'activer. Afin de voir l'impact des défauts d'expression des protéines TIAM dans les souris *Mtm1*<sup>-y</sup>, j'ai analysé l'état d'activation de la GTPase RAC1. Les résultats ont montré que l'activité de RAC1 est significativement diminuée dans les TA des souris *Mtm1*<sup>-y</sup>. RAC1 est connue pour son rôle dans la régulation de la polymérisation de l'actine. L'analyse de l'état de polymérisation de l'actine dans le muscle TA des souris *Mtm1*<sup>-y</sup> a révélé une prédominance de la fraction de l'actine globulaire (actine G) par

rapport à l'actine filamenteuse (actine F). De plus, j'ai pu observer une diminution importante de l'expression d'ACTR3B, une sous-unité du complexe Arp2/3, régulé par RAC1, et impliqué dans la nucléation et la polymérisation de l'actine. Par ailleurs, j'ai également analysé le nombre et l'organisation des câbles d'actine dans les myoblastes primaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* par marquage de la phalloïdine en immunofluorescence (IF). Les résultats de l'IF ont révélé la présence d'agrégats d'actine, pouvant correspondre à l'actine non polymérisée (actine G), ainsi qu'une réduction du nombre de câbles d'actine périnucléaire. Cette dérégulation avérée dans l'organisation du cytosquelette d'actine pourrait être à l'origine des défauts de localisation des organites cellulaires, notamment des noyaux centraux des fibres musculaires.

En plus de son rôle de régulateur de l'architecture subcellulaire, le cytosquelette d'actine régule également les voies moléculaires impliquées dans la mécanotransduction, notamment la voie Hippo. Les effecteurs de la voie Hippo sont deux co-activateurs transcriptionnels : YAP et TAZ qui se relocalisent entre le cytoplasme et le noyau en fonction de leur état de phosphorylation, médiée par la voie Hippo, en réponse à des stimuli mécaniques externes. L'analyse de cette voie dans les TA de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* a révélé une hyper-phosphorylation de la protéine YAP en S127, associée à une séquestration cytoplasmique de cette protéine. L'analyse des niveaux d'expression des gènes cibles de la voie YAP/TAZ dans ces souris est également dérégulée. Par ailleurs, j'ai pu observer une altération de la localisation de YAP/TAZ dans les cultures primaires de myoblastes et de myotubes en différenciation de souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Ces résultats indiquent que la voie TIAM-RAC1-actine et la mécanotransduction médiée par YAP et TAZ seraient dérégulées précocement, au cours du développement embryonnaire des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*.

La mécanotransduction est régulée à la fois par les adhésions focales (FAs) et par le cytosquelette d'actine et médiée par la voie YAP/TAZ permettant d'activer l'expression de gènes cibles en réponse à des stimuli provenant de l'environnement extracellulaire. Les FAs sont des complexes multi-protéiques servant de points d'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire, par le moyen des intégrines. Elles établissent le lien entre l'environnement extracellulaire et les protéines du cytosquelette, permettant de réguler les mécanismes d'adhésion, migration et polarité cellulaires. J'ai pu mettre en évidence des défauts d'expression de la paxilline, une protéine du complexe des adhésions focales permettant la liaison des intégrines et de l'actine, qui était surexprimée dans les muscles des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Cette dérégulation s'ajoute à la surexpression de



la vinculine et de l'intégrine  $\beta 1$  et à la diminution de la phosphorylation de FAK en Y397, suggérant une altération de l'intégrité des adhésions focales. De plus, on a pu observer une diminution dans l'adhésion et dans la migration des myoblastes primaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>*, qui seraient la conséquence des défauts avérés des adhésions focales. Les fibres musculaires des patients atteints la XLCNM ou des souris *Mtm1<sup>-y</sup>* sont caractérisées par une altération de la localisation nucléaire, caractéristiques évocatrices de défauts du cytosquelette. J'ai analysé la distance entre les noyaux de myotubes *Mtm1<sup>-y</sup>* en cours de différenciation et trouvé une réduction significative de l'espace inter-nucléaire, avec une accumulation des noyaux des fibres en formes de « sacs de noyaux ». Ces résultats suggèrent que la dérégulation de la voie TIAM-RAC1-actine pourrait être à l'origine des défauts caractéristiques des fibres musculaires de patients, notamment les défauts de localisation des organites et la centralisation des noyaux, ainsi que les défauts structuraux tels que la petite taille et la forme ronde des fibres musculaires, qui seraient liés à la diminution ou la perte des adhésions focales.

Les défauts de la voie TIAM-RAC1-actine ont été identifiés dans les myoblastes primaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* et durant la phase pré-symptomatique de la maladie. Ces données suggèrent que l'altération de cette voie serait une cause des principaux phénotypes associés à la XLCNM. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai établi deux modèles cellulaires, dans lesquels j'ai soit diminué l'expression de *Tiam1* par l'utilisation d'un shRNA, ou inhibé l'activité de RAC1 grâce à un inhibiteur pharmacologique spécifique de RAC1 (NSC23766). L'analyse du phénotype de ces cellules a montré des défauts dans les adhésions focales, l'adhésion et la migration cellulaires, tels qu'observés dans les myoblastes primaires *Mtm1<sup>-y</sup>*. Par ailleurs, l'analyse *in vivo* de souris *Tiam1<sup>-/-</sup>*, dans lesquelles l'expression de *Tiam1* est abolie, a révélé des défauts moteurs et histologiques similaires à la XLCNM. Par ailleurs, j'ai généré des modèles de souris *Mtm1<sup>-y</sup>; Tiam1<sup>+/-</sup>* et *Mtm1<sup>-y</sup>; Tiam1<sup>-/-</sup>* dans lesquels on réduit soit de moitié ou complètement l'expression de *Tiam1*. Les résultats ont montré que l'inhibition de l'expression de *Tiam1* aggrave les défauts moteurs et histologiques des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Nos résultats indiquent que les défauts de la voie TIAM-RAC1-actine seraient à l'origine des principaux phénotypes histologiques et moteurs de la XLCNM et suggèrent *TIAMI* comme gène modificateur de la maladie.

Les travaux de ma thèse ont permis d'identifier la voie moléculaire TIAM-RAC1-actine altérée dans la forme sévère de myopathies centronucléaires XLCNM. D'après mes résultats,

l'altération de cette voie de signalisation serait à l'origine des défauts phénotypiques et histologiques observés chez les patients XLCNM et dans le modèle murin de cette myopathie. Les perspectives à court terme de mon projet de thèse viseront à développer une approche nous permettant de rétablir cette voie de signalisation, en espérant que ce traitement contribue à améliorer les phénotypes associés. Une approche possible serait la surexpression de la protéine TIAM1 ou l'inhibition des protéines inhibitrices de RAC1 (GAPs) en vue d'une réactivation de la voie TIAM-RAC1. A long terme, il serait intéressant de voir si la dérégulation de cette voie est un biomarqueur de la maladie associée aux autres formes de CNMs. Si tel est le cas, cette voie constituerait une cible commune dans le cadre du développement d'une approche thérapeutique qui soit applicable aux différentes CNMs.

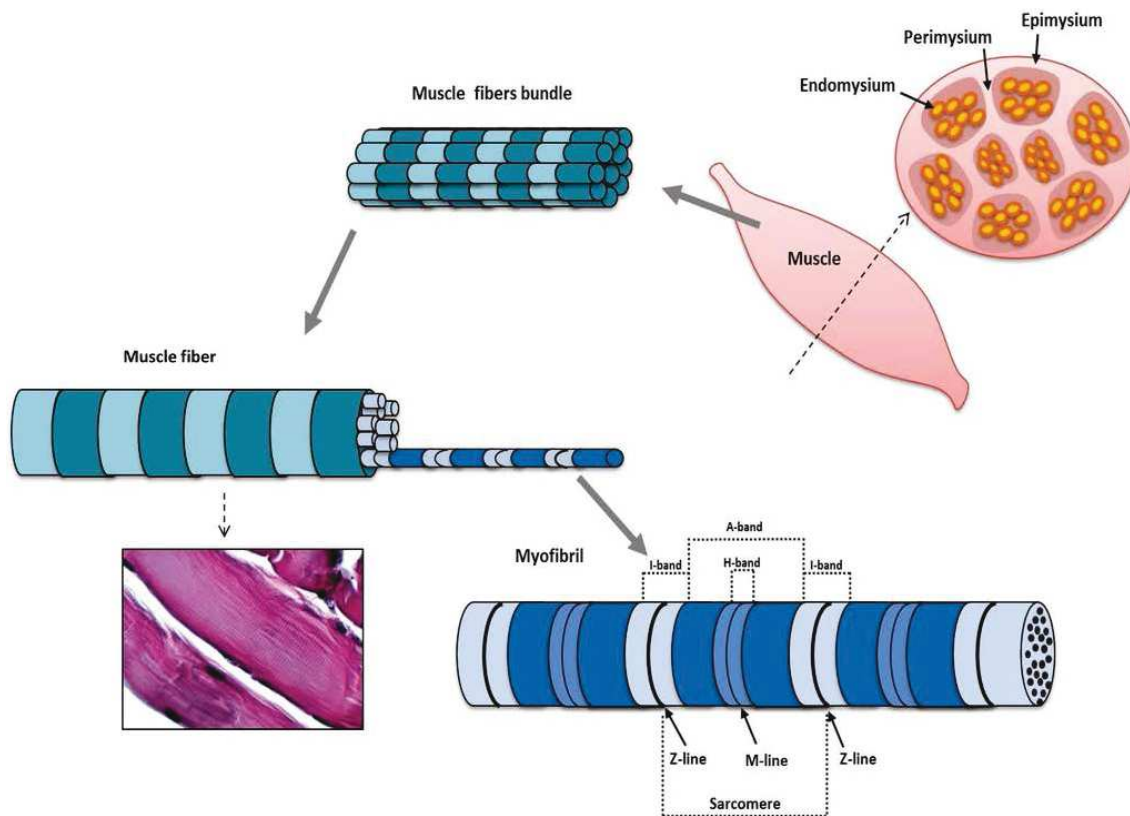
# **INTRODUCTION**

# 1 Brève introduction à la biologie du muscle squelettique

Le muscle squelettique est l'organe le plus abondant et le plus dynamique du corps humain. Il représente environ 40% de la masse corporelle d'un adulte. On compte plus de 600 muscles chez un individu adulte et tous sont indispensables à la production de l'énergie nécessaire aux mouvements volontaires tels que la locomotion et le maintien de la posture, mais également au maintien de l'équilibre métabolique et à la thermogénèse résultant de la contraction musculaire (Frontera and Ochala, 2015).

Le muscle squelettique est caractérisé par une structure unique et une organisation hautement complexe. Il se compose d'un nombre important de fibres musculaires multinucléées, entourées d'un tissu conjonctif dense: l'épimysium. Cette structure intervient dans la contraction musculaire et permet de protéger et d'isoler le muscle des autres organes. À l'intérieur, chaque faisceau de fibres est entouré par une autre couche de tissu conjonctif appelée le périmysium, et chaque fibre musculaire est entourée par une fine couche de tissu conjonctif : l'endomysium. Ces trois couches de tissu conjonctif (épimysium, périmysium et endomysium) permettent la vascularisation et l'innervation des fibres musculaires (Figure 1) (Trovato, 2016).

Chez les mammifères, la myogenèse débute au cours de la vie embryonnaire, à partir des somites, structures mésodermiques transitoires, qui donnent naissance aux précurseurs des cellules musculaires (originaires du dermomyotome) (Rochlin et al., 2010). La formation des fibres musculaires implique la prolifération de myoblastes qui se différencient en myocytes post-mitotiques. Ces myocytes fusionnent ensuite pour former des myotubes multinucléés (Figure 2). La maturation de ces myotubes aboutit à la formation d'une structure cylindrique multinucléée et hautement organisée : la fibre musculaire, dont les noyaux sont alignés le long de la fibre et localisés en périphérie, au contact de la membrane plasmique : le sarcolemme. Le sarcoplasme, ou cytoplasme des fibres musculaires, abrite plusieurs organites cellulaires essentiels à la fonction musculaire, notamment l'appareil de golgi, les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique et les noyaux. Cependant, la majeure partie des fibres musculaires est occupée par les myofibrilles alignées tout au long de la fibre musculaire. Les myofibrilles correspondent à un enchaînement hautement ordonné des unités contractiles du muscle : les sarcomères. Chaque sarcomère est composé de myofilaments fins d'actine et épais de myosine. Ces myofilaments sont organisés en

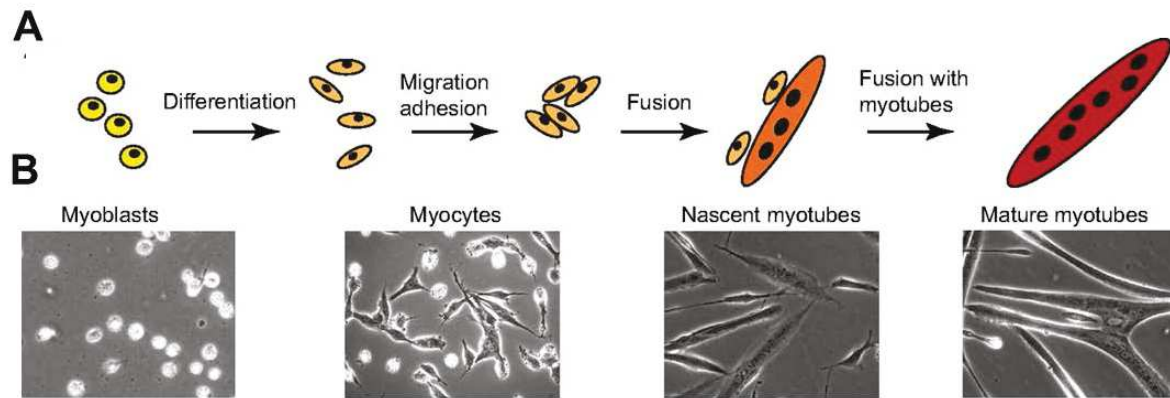


**Figure 1. La morphologie du muscle squelettique.**

Cette représentation schématique montre les différentes couches de tissu conjonctif du muscle squelettique : l'épimysium entourant le muscle squelettique, le périmysium entourant chaque faisceau de fibres musculaires et l'endomysium entourant chaque fibre musculaire. Le sarcoplasme de chaque fibre musculaire est composé de myofibrilles alignées le long de l'axe longitudinal de la fibre musculaire. Les myofibrilles sont des myofilaments ordonnés, composés de la bande-A, avec au centre la bande-H composée de myofilaments épais de myosine, la bande-I, composée de myofilaments fins d'actine et la ligne Z. Le sarcomère est l'unité contractile d'une myofibrille et délimité par deux lignes Z. La coupe histologique d'une section longitudinale de muscle, colorée à l'Éosine-Hématoxyline, montre l'aspect strié d'une fibre musculaire, composée d'une alternance de bandes-A (sombres) et de bandes-I (claires). Adapté de Trovato et al. 2016.

bandes parallèles donnant ainsi son aspect strié au muscle squelettique. Chaque sarcomère est délimité par deux lignes Z, qui apparaissent sombres en microscopie électronique. La bande-I correspond à la zone du sarcomère occupée uniquement par les filaments fins d'actine. La partie centrale du sarcomère occupée par les filaments épais de myosine correspond à la bande-H. La longueur totale d'un filament épais de myosine est appelée la bande-A (Figure 1).

La contraction du muscle squelettique est initiée par un potentiel d'action généré par un neurone moteur et transmis aux fibres musculaires au niveau de la jonction neuromusculaire. Le neurone moteur libère un neurotransmetteur qui se lie à des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine présents à la surface des fibres musculaires. Ceci entraîne une dépolymérisation de la membrane des cellules et des changements de conformation des canaux à calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) voltage-dépendants : les récepteurs à dihydropyridine (DHPR), présents sur les tubules transversaux (tubules-T). Les tubules-T sont des invaginations régulières du sarcolemme qui sont au contact des myofibrilles et permettent une transmission profonde de la dépolymérisation de la membrane dans les fibres musculaires. Le changement conformationnel des récepteurs DHPR entraîne une libération du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le réticulum sarcoplasmique (RS) vers le cytoplasme, à travers les récepteurs à ryanodine (RYR) voltage-dépendant. Cette libération du second messenger  $\text{Ca}^{2+}$  permet ainsi la contraction des fibres musculaires. Ce processus de conversion d'un signal électrique en contraction mécanique du muscle squelettique est appelé le couplage excitation-contraction. Il a lieu au niveau des triades, structures composées d'un tubule-T associé avec deux citernes terminales du réticulum sarcoplasmique, localisées entre les bandes A et I du sarcomère (Al-Qusairi and Laporte, 2011; Messaddeq et al., 2009; Mukund and Subramaniam, 2020).



**Figure 2. La différenciation des myoblastes en myotubes, en culture.**

(A) Schéma et (B) images de microscopie en contraste de phase, montrant les étapes principales de la fusion des myoblastes en myotubes, en culture. Les myoblastes fusionnent pour former des myocytes qui migrent, adhèrent et fusionnent entre eux pour former des myotubes. Les myotubes naissants fusionnent avec d'autres myocytes et forment de larges myotubes matures et multinucléés. Adapté d'Abmayr & Pavlath, 2012.

## **2 Myopathies et myopathies congénitales**

### **2.1 Les myopathies congénitales**

Les myopathies congénitales regroupent un ensemble de désordres musculaires d'origine génétique. Les patients atteints de myopathies congénitales présentent des signes cliniques typiques tels qu'une hypotonie généralisée et une faiblesse des muscles respiratoires et bulbaires en plus d'avoir une hypotrophie des fibres musculaires. L'incidence des myopathies congénitales est estimée à 1 sur 25.000 naissances par an et elles représentent 14% des cas d'hypotonie néonatale. La classification des myopathies congénitales se fait sur la base d'analyses histopathologiques de biopsies musculaires, d'un diagnostic génétique basé sur le séquençage à haut débit ou sur des techniques d'imagerie notamment l'imagerie par résonance magnétique (IRM). On retrouve ainsi cinq formes principales de myopathies congénitales : les myopathies à némaline, les myopathies à cores, les myopathies centronucléaires, les myopathies congénitales avec disproportion des types de fibres musculaires et les myopathies à corps hyalins (Cassandrini et al., 2017; Claeys, 2020; Ravenscroft et al., 2018). La majorité des gènes mutés dans les myopathies congénitales est impliquée dans la régulation des fonctions musculaires telles que le couplage excitation-contraction, l'homéostasie calcique, l'assemblage et le bon fonctionnement des sarcomères, le trafic membranaire et l'autophagie (Claeys, 2020; Jungbluth and Voermans, 2016; Jungbluth et al., 2017). Les techniques de génétique et de biologie moléculaire modernes ont permis de faciliter la compréhension des mécanismes pathologiques impliqués dans les myopathies congénitales et conduit au développement de pistes thérapeutiques prometteuses, dont certaines sont en phase d'essais préclinique (Jungbluth et al., 2017).

Durant mes trois années de thèse, je me suis intéressée essentiellement aux myopathies centronucléaires.

### **2.2 Les myopathies centronucléaires**

Les myopathies centronucléaires (CNMs) constituent un sous-groupe hétérogène de myopathies congénitales très invalidantes. Elles sont cliniquement caractérisées par une faiblesse musculaire généralisée affectant essentiellement les muscles respiratoires et bulbaires, entraînant



ainsi des insuffisances respiratoires aiguës. Dans certains cas, cette faiblesse musculaire est observée dès la vie prénatale avec une réduction des mouvements fœtaux. L'analyse histologique des biopsies de patients montre une importante atrophie des fibres musculaires avec une localisation anormalement centrale des noyaux, en l'absence de régénération musculaire excessive, ce qui donne son nom à la maladie (Jungbluth and Gautel, 2014; Jungbluth et al., 2008; Romero, 2010; Romero and Bitoun, 2011; Tasfaout et al., 2018). La classification actuelle des myopathies centronucléaires est basée sur leur mode de transmission génétique et des gènes causaux. On retrouve ainsi :

- La myopathie myotubulaire liée au chromosome X (ou myopathie centronucléaire liée au chromosome X : XLCNM), due à des mutations sur le gène codant la myotubularine (MTM1) (Laporte et al., 1996).
- Les myopathies autosomiques récessives ou dominantes dues à des mutations sur les gènes codant pour l'amphiphysine 2 (BIN1) (Nicot et al., 2007), la dynamine 2 (DNM2) (Bitoun et al., 2005), le récepteur de la ryanodine du muscle squelettique (RYR1) (Wilmschurst et al., 2010), la protéine 14 liée aux myotubularines (MTMR14 appelée également hJUMPY) (Tosch et al., 2006), la titine (TTN) (Ceyhan-Birsoy et al., 2013) et la protéine kinase « Striated muscle preferentially expressed protein kinase » (SPEG) (Agrawal et al., 2014).

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

La myopathie centronucléaire liée au chromosome X (appelée également myopathie myotubulaire) fut décrite pour la première fois en 1966 par Alfred Spiro. Après avoir analysé la biopsie musculaire d'un patient âgé de 12 ans souffrant d'une faiblesse musculaire généralisée, un ptosis et une ophtalmoplégie, il constata la présence de fibres musculaires hypotrophiques à l'aspect immature avec la présence de noyaux centraux ressemblant aux myotubes fœtaux. C'est ainsi qu'il lui attribua le nom de « myopathie myotubulaire », pensant que la maladie résultait d'un arrêt prématuré de la maturation des fibres musculaires (Spiro et al., 1966).

### **2.3.1 Incidence, aspects cliniques et histologiques de la XLCNM**

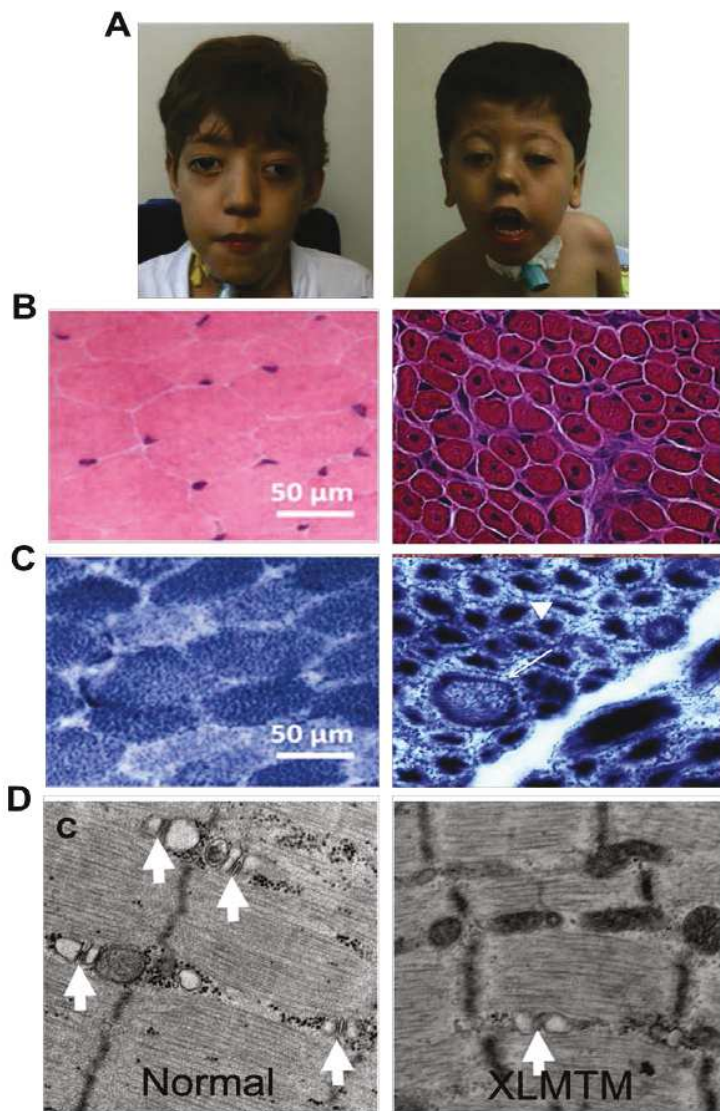
La myopathie myotubulaire représente la forme la plus grave et la plus fréquente des CNMs. Son incidence est d'environ 1 garçon sur 50.000 nouveau-nés par an (Jungbluth et al., 2008). La

XLCNM est plus fréquente chez la population masculine, cependant quelques rares cas de femmes symptomatiques ont été rapportés. Leurs symptômes sont plus bénins avec une faiblesse musculaire beaucoup moins sévère que chez les garçons, et seraient probablement dus à une inactivation en mosaïque du chromosome X (Biancalana et al., 2017).

Les premiers signes de la maladie sont souvent observés au cours de la vie prénatale avec notamment une réduction des mouvements fœtaux liée à un hydramnios (excès de liquide amniotique). Cet hydramnios serait la conséquence des difficultés du fœtus à déglutir une partie du liquide amniotique, phénomène observé naturellement chez le fœtus au cours de toute la grossesse. On observe également un amincissement des côtes sur la poitrine du fœtus, symptôme associé à cette maladie (Jungbluth et al., 2008).

À la naissance, les nouveau-nés atteints de myopathie myotubulaire présentent une faiblesse musculaire généralisée et très marquée et une insuffisance respiratoire très sévère, et parfois même une asphyxie. En outre, ils ont souvent des caractéristiques physiques telles qu'un allongement du visage, une dolichocéphalie, une diplégie faciale et une déformation thoracique évoluant souvent vers une scoliose et une ophtalmoplégie (paralysie des muscles oculomoteurs). Les nouveaux nés ont souvent une macrocéphalie et sont macrosomiques (corps plus large que la taille normale) (Figure 3) (Dowling, 2019; Herman et al., 1999; Jungbluth et al., 2008).

Du fait de sa sévérité, cette pathologie est le plus souvent létale durant les premières heures ou premiers mois de la vie. Une très faible proportion de garçons parvient à survivre jusqu'à l'âge pubère, et plus rarement jusqu'à l'âge adulte. Leur survie dépend strictement d'une assistance respiratoire (trachéotomie) et d'un suivi et une aide médicale permanents, et nécessitent un déplacement constant sur une chaise roulante. En plus des difficultés respiratoires sévères et l'hypotonie généralisée, les malades ayant une durée de vie plus longue souffrent souvent d'autres anomalies telles que des hémangiomes hépatiques, une sténose du pylore, des calculs rénaux et biliaires et d'autres anomalies génitales et endocriniennes pouvant se compliquer jusqu'à entraîner la mort des patients (Dowling, 2019; Herman et al., 1999; Jungbluth et al., 2008). En revanche, contrairement à d'autres types de myopathies où la fonction cardiaque peut être affectée, les



**Figure 3. Principales caractéristiques cliniques, histologiques et structurales de la XLCNM.**

(A) Deux patients atteints de la XLCNM, avec une trachéotomie et présentant une parésie faciale, un visage allongé, un ptosis et une ophtalmoparésie. (B) Coloration à l'Éosine-Hématoxyline, d'une biopsie musculaire d'un individu sain (à gauche) et d'un patient atteint de la XLCNM (à droite). Les fibres du patient XLCNM sont arrondies avec des noyaux internalisés contrairement aux fibres musculaires de l'individu sain qui sont de forme hexagonale avec des noyaux périphériques. (C) Coloration NADH-TR d'une biopsie musculaire d'un individu sain (à gauche) et d'un patient XLCNM (à droite). Les muscles de patients XLCNM présentent des anomalies de distribution mitochondriale formant des agrégats au centre ou un halo (flèches blanches). A, B et C adaptés de Böhm et al., 2013 et Abath Neto et al., 2016. (D) Microscopie électronique de coupes longitudinales de muscle sain (à gauche) et d'un patient XLCNM (à droite). Les muscles de patients XLCNM ont des défauts dans la structure des triades et de l'alignement des lignes-Z. Les flèches blanches indiquent les triades. Adapté de Lawlor et al., 2016.

patients atteints de myopathie myotubulaire ne souffrent généralement pas de cardiopathies ni d'atteintes intellectuelles (quotient intellectuel normal).

D'un point de vue histologique, les biopsies de patients atteints de la myopathie myotubulaire sont caractérisées par des fibres musculaires de très petite taille à la forme arrondie avec des noyaux centraux, leur donnant un aspect de myotubes fœtaux (Figure 3) (Spiro et al., 1966). Elles se caractérisent également par un élargissement de la matrice extracellulaire séparant les différentes fibres musculaires. La centralisation des noyaux est observée dans tous les muscles squelettiques notamment les muscles oculomoteurs, et affecte plus de 90% des fibres. Les études histologiques montrent également une prédominance des fibres musculaires de type 1 avec une importante amyotrophie (atrophie des fibres musculaires), caractéristiques pouvant apparaître avant même l'apparition des noyaux centraux. Les coupes transversales de muscle de patients révèlent la présence d'un halo, une zone dépourvue de matériel contractile (myofibrilles), autour des noyaux centraux, observée à l'aide de colorations telles que la coloration «succinate déshydrogénase» (SDH) ou «nicotinamide adénine dinucléotide tetrazolium réductase» (NADH-TR). En plus de la centralisation des noyaux, on observe également des défauts de localisation des autres organites cellulaires avec notamment une agrégation des mitochondries et du glycogène dans la zone périnucléaire, ainsi qu'une désorganisation générale du système sarcotubulaire avec une accumulation des tubules-T et des citernes du réticulum sarcoplasmique au centre des fibres en plus de défauts d'alignement des myofibrilles (Figure 3) (Craene JOD, 2015; Dowling, 2019; Jungbluth et al., 2008; Lawlor et al., 2013; Romero, 2010; Romero and Bitoun, 2011). La microscopie électronique révèle des défauts de maturité de la jonction neuromusculaire avec une réduction des récepteurs à l'acétylcholine à la surface des cellules musculaires accompagnée d'une simplification de la membrane post-synaptique (réduction des fentes synaptiques secondaires) (Fidziarfiska, 1994). Les anomalies observées par les analyses structurales ont été confirmées par des études immunohistochimiques. Les biopsies de patients montrent une accumulation de DHPR et RYR1 au centre des fibres, deux protéines localisées normalement sur les tubules-T et sur le réticulum sarcoplasmique, respectivement (Shichiji et al., 2013). L'immunohistochimie révèle une persistance anormale de l'expression d'isoformes fœtales de protéines comme la myosine suggérant un retard de maturation des fibres musculaires, bien que cette hypothèse ne soit pas la plus privilégiée. Par ailleurs, le marquage de la laminine et du collagène montre une surexpression

de ces deux protéines, indiquant des défauts dans la composition de la matrice extracellulaire des muscles de ces patients (Van Der Ven et al., 1995).

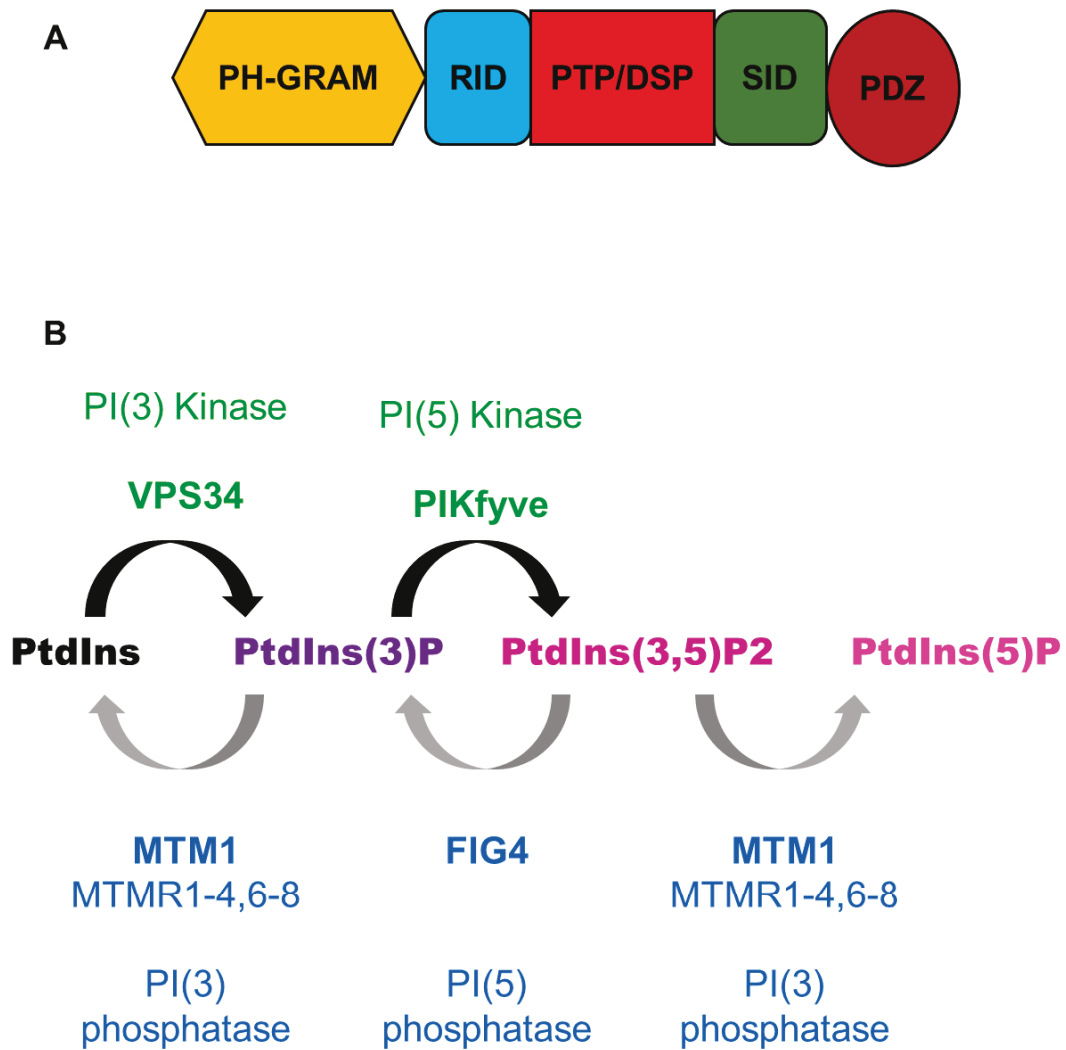
### **2.3.2 Identification et caractérisation du gène impliqué : *MTM1***

Le caractère maternel de la transmission de la myopathie myotubulaire fut établi durant les années 70 et permit la restriction des recherches du gène causal de la myopathie au chromosome X. Par la suite, d'autres études ont permis de cartographier la région Xq28 du chromosome X portant le gène candidat (Braga and Al, 1993; Thomas et al., 1990). Ce n'est qu'en 1996 que les travaux menés par Laporte *et al.* ainsi qu'un consortium de deux autres laboratoires, ont permis de localiser la région candidate de 280 kb et par la suite, ont pu cloner et identifier la mutation du gène responsable de la myopathie myotubulaire liée au chromosome X qu'ils ont nommé *MTM1*, codant pour une protéine baptisée la myotubularine (Laporte et al., 1996) (OMIM#310400).

*MTM1* est un gène d'une taille de 104 749 paires de bases (pb) constitué de 15 exons (Laporte et al., 1998). Ce gène code pour un transcrit de forme ubiquitaire d'une taille de 3.9 kb et un autre transcrit qui est spécifique du muscle et du testicule d'une taille de 2.4 kb.

### **2.3.3 Caractérisation de la protéine impliquée : *MTM1***

Le gène *MTM1* code pour la myotubularine (MTM1), une protéine de 603 acides aminés, appartenant à une large famille de protéines PTP (Protein Tyrosine Phosphatase). La protéine MTM1 est hautement conservée au cours de l'évolution, des levures jusqu'aux mammifères. Elle déphosphoryle le phosphate D3 de l'anneau inositol de deux types de phosphoinositides (PIP) : le phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) et le phosphatidylinositol 3,5-biphosphate (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) (Taylor et al., 2000). La famille des myotubularines comporte également 13 autres protéines associées aux myotubularines, appelées les MTMRs (myotubularin-related). Elles possèdent toutes le domaine PH-GRAM. Six d'entre elles n'ont pas d'activité catalytique phosphatase (MTMR5 et MTMR9-13), appelées les « phosphatases-mortes », sont impliquées dans la régulation de l'activité phosphatase des myotubularines actives (Begley and Dixon, 2005). Il a été montré que plusieurs pathologies humaines graves sont associées à des mutations dans ces autres myotubularines. C'est le cas



**Figure 4. Les domaines protéiques de MTM1 et son activité de phosphatase à phosphoinositides.**

(A) Représentation schématique des domaines protéiques de MTM1 : le domaine Pleckstrin Homology Glucosyltransférase, Rab-like GTPase Activator and Myotubularin (PH-GRAM), le domaine RAC1-Induced recruitment Domain (RID), le domaine Protein Tyrosine Phosphatase/Dual-Specificity Phosphatase (PTP/DSP), le domaine SET-protein Interaction Domain (SID) et le domaine PSD-95/DlgA/ZO-1 (PDZ). (B) La synthèse des phosphoinositides chez l'humain. Les kinases sont représentées en vert et les phosphatases en bleu. Adapté de Craene et al, 2017.

notamment de la neuropathie de Charcot-Marie-Tooth, associée à des mutations sur MTMR2 et MTMR13 (Azzedine et al., 2003).

La protéine MTM1 humaine est constituée de quatre principaux domaines, essentiels à son activité (Figure 4) :

Le domaine PH-GRAM (Pleckstrin Homology Glucosyltransférase, Rab-like GTPase Activator and Myotubularin) : situé au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine (acides aminés 29 à 160). Ce domaine permet la liaison aux lipides membranaires, notamment les phosphoinositides, et aux protéines régulatrices. Le domaine PH-GRAM de MTM1 possède une grande affinité pour le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> endosomal (Tsujita et al., 2004).

Le domaine RID (RAC1-Induced recruitment Domain) : situé entre les acides aminés 161 et 272 de la protéine MTM1. Ce domaine joue un rôle crucial dans le recrutement de MTM1 à la membrane plasmique après activation de RAC1 (Laporte et al., 2002). Ce domaine permet également l'interaction de MTM1 avec la desmine, lui conférant également une localisation à la membrane plasmique (Hnia et al., 2011).

Le domaine PTP/DSP (Protein Tyrosine Phosphatase/Dual-Specificity Phosphatase) : situé entre les acides aminés 273 et 471 de la protéine MTM1, il renferme le domaine catalytique consistant en un motif CX5R (VHCSDGWDRT), qui est le domaine catalytique conservé de toutes les myotubularines. Trois résidus principaux définissent l'activité catalytique de ce domaine : les résidus cystéine et arginine qui servent à former un intermédiaire thiophosphate et à stabiliser le groupement phosphate, respectivement et l'aspartate est impliqué dans la libération du produit de la catalyse (Laporte et al., 2003).

Le domaine SID (SET-protein Interaction Domain) : situé entre les acides aminés 435 et 486 de la protéine MTM1. Ce domaine spécifique à la famille des myotubularines est impliqué dans la liaison des protéines contenant le domaine SET (Survar3-9, Enhancer of zeste, Tritorax). SET joue un rôle d'histone méthyltransférase et intervient dans la régulation épigénétique de l'expression de certains gènes (Cui et al., 1998).

À ce jour, plus de 200 mutations (non-sens, faux-sens, délétion, insertion) dans les différents domaines de la protéine MTM1 ont été rapportées, entraînant soit l'absence ou la diminution de l'expression de la protéine MTM1. Ces mutations entraînent toutes la même maladie montrant

ainsi le rôle crucial que jouent ces domaines protéiques dans les différentes fonctions cellulaires de la protéine MTM1 (Craene JOD, 2015; Laporte et al., 2003).

### **2.3.4 Fonctions cellulaires de MTM1**

La protéine MTM1 intervient dans plusieurs fonctions cellulaires grâce à son activité de phosphatase à phosphoinositides. Les phosphoinositides sont des lipides membranaires, faiblement abondants dans la membrane plasmique (moins de 10%), qui jouent le rôle de seconds messagers, transmettant ainsi des signaux intracellulaires en réponse à des stimuli externes. Ils interviennent dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et dans la régulation de mécanismes clés pour le bon fonctionnement du muscle squelettique (Marat and Haucke, 2016; Di Paolo and De Camilli, 2006). Leur taux et leur renouvellement sont finement régulés par l'action antagoniste de kinases et phosphatases à phosphoinositides (Figure 4).

#### *✓ Rôles dans la régulation des phosphoinositides*

La fonction principale de MTM1 consiste à réguler l'état de phosphorylation des phosphoinositides par son activité phosphatase. Elle déphosphoryle notamment l'anneau inositol en position D3 de deux types de phosphoinositides, qui sont ses principaux substrats : le PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>. Les PtdIns3P et PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> sont produits et localisés au niveau des endosomes précoces et des endosomes tardifs, respectivement. Les produits de la catalyse de ces deux substrats sont, respectivement, le phosphatidylinositol (PI) et le phosphatidylinositol 5-phosphate (PtdIns5P) (Lorenzo et al., 2006; Taylor et al., 2000; Tronchère et al., 2004). Des études ont montré que le PtdIns5P est présent soit dans les noyaux (Jones et al., 2006) ou produit au niveau de la membrane des endosomes tardifs, où il permet la régulation du trafic membranaire et le trafic des endosomes (Figure 4) (Lecompte et al., 2008; Viaud et al., 2014).

#### *✓ Rôles dans le trafic et le remodelage membranaires*

Plusieurs études ont montré que l'activité phosphatase de la protéine MTM1 lui permet de jouer un rôle clé dans le remodelage et le trafic membranaire. Il a été montré que la surexpression de MTM1 entraîne des défauts dans le trafic vésiculaire résultant d'une accumulation de PtdIns3P et de PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, indiquant le rôle crucial que joue MTM1 dans le trafic vésiculaire (Tsujita et al., 2004). Par ailleurs, des travaux menés sur la drosophile ont montré que l'orthologue de MTM1



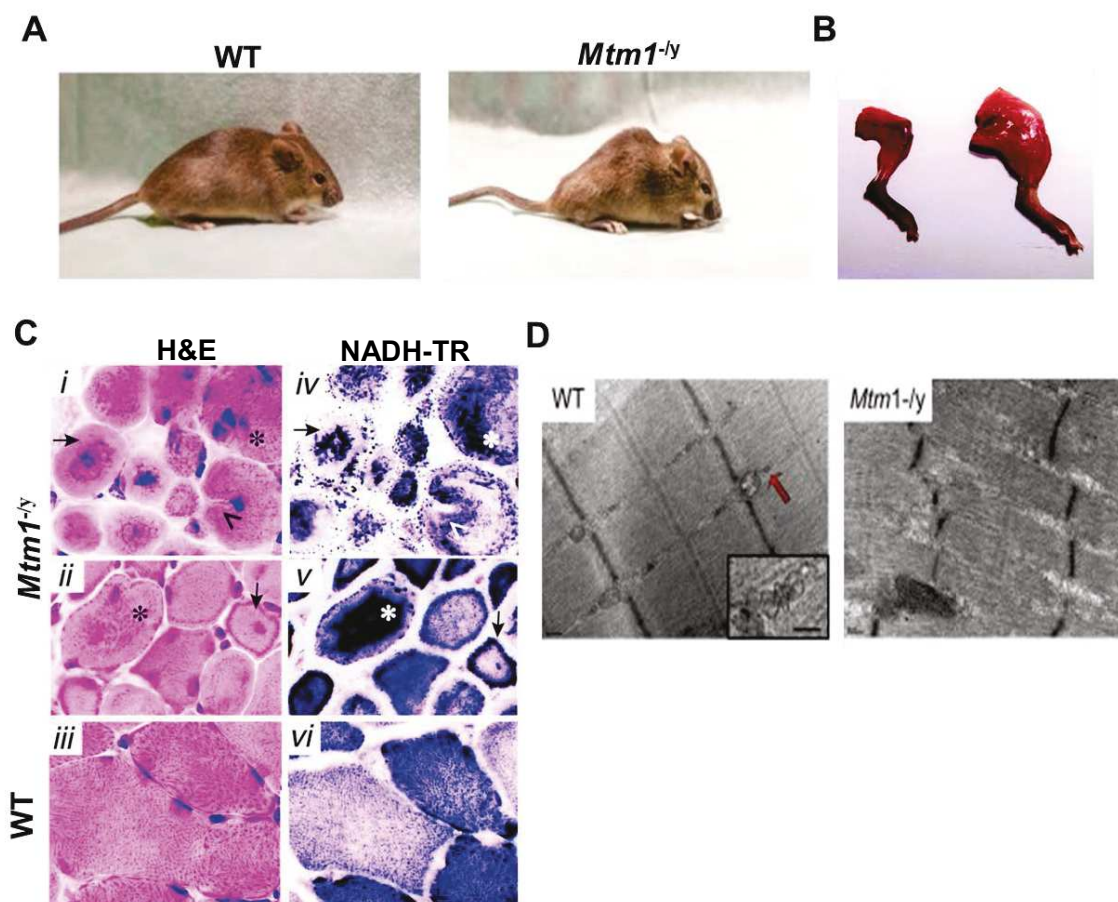
humaine chez la drosophile coordonne avec les PI3K de classe II les niveaux de PtdIns3P dans les cellules, et leur permet ainsi de réguler à la fois les fonctions endo-lysosomales et le remodelage de l'actine corticale (Velichkova et al., 2010). Plusieurs études ont montré l'importance du recyclage des intégrines et le rôle crucial de MTM1 dans le trafic endosomal et dans le maintien de l'intégrité du muscle squelettique. Les travaux menés par Ribeiro *et al.* ont montré que l'inactivation de *mtm* chez la drosophile entraîne une accumulation anormale de l'intégrine  $\beta 1$  avec le PtdIns3P dans les endosomes ainsi que des défauts de l'adhésion des fibres musculaires (Ribeiro et al., 2011). Cette accumulation de l'intégrine  $\beta 1$  a été également observée dans des fibroblastes de patients atteints de la myopathie myotubulaire XLCNM (Ketel et al., 2016).

#### ✓ Rôles dans la régulation du cytosquelette

D'autres études ont mis en évidence l'implication de la protéine MTM1 dans la régulation des filaments intermédiaires, structures du cytosquelette hautement spécialisées et requises pour le positionnement des organites et la fonction cellulaires. Hnia *et al.* (2011) ont montré que MTM1 lie la desmine, la protéine la plus abondante des filaments intermédiaires dans le muscle squelettique, et permet la régulation de son assemblage et son architecture. Ils ont également montré que l'absence ou les mutations de la myotubularine, tout comme l'absence de la desmine (Milner et al., 2000), entraînent des défauts de l'architecture et de la localisation des mitochondries, montrant ainsi l'importance de cette liaison MTM1-desmine dans l'architecture et la dynamique mitochondriales (Hnia et al., 2011).

En plus de son rôle clé dans la régulation du remodelage membranaire, le trafic des endosomes et dans le maintien du cytosquelette, MTM1 intervient dans d'autres fonctions cellulaires requises pour le bon fonctionnement du muscle squelettique. MTM1 régule notamment la balance entre l'autophagie et la voie de l'ubiquitine-protéasome, et l'absence de MTM1 dans les souris entraîne des défauts de l'autophagie et une accumulation des marqueurs de l'autophagie comme LC3 et P62 (Al-Qusairi et al., 2013). Par ailleurs, il semblerait que MTM1 intervienne également dans l'adressage des protéines musculaires mal-repliées vers le protéasome en formant un complexe avec l'ubiquiline-2 (UBQLN2), permettant ainsi de réguler le renouvellement des protéines musculaires (Gavriilidis et al., 2018).

### **2.3.5 Les animaux modèles de la myopathie myotubulaire (XLCNM)**



**Figure 5. Le modèle murin de la myopathie myotubulaire: *Mtm1*<sup>-/-</sup>.**

(A) Photographies des souris *Mtm1*<sup>-/-</sup> et souris sauvages (WT : wild-type) âgées de 6 semaines et demi. La souris *Mtm1*<sup>-/-</sup> montre des signes d'une faiblesse généralisée, une cyphose, et une paralysie des membres postérieurs. Adapté de Gayi et al., 2018. (B) Photographie de muscles des souris *Mtm1*<sup>-/-</sup> et WT. Le volume et la masse musculaire de la souris *Mtm1*<sup>-/-</sup> (à gauche) est significativement réduit comparé au muscle de souris WT (à droite). (C) Biopsies musculaires de souris *Mtm1*<sup>-/-</sup> et de souris WT, âgées de 6 semaines, colorées à l'Éosine-Hématoxyline (panneau de gauche) et à la NADH-TR (panneau de droite). Les myofibres de souris WT (iii et vi) sont hexagonales avec une localisation périphérique des noyaux, et ont une coloration NADH-TR homogène, alors que les muscles de souris *Mtm1*<sup>-/-</sup> (i, ii, iv, v) sont arrondies, avec des noyaux internalisés (flèches noires) et une accumulation centrale (flèche noires) ou périphérique (\*) du marquage NADH-TR. Adapté de Buj-Bello et al., 2002. (D) Microscopie électronique de coupes longitudinales du muscle squelettique de souris WT et *Mtm1*<sup>-/-</sup> montrant des défauts d'alignement de la ligne-Z et une réduction du nombre de triades dans les muscles de la souris *Mtm1*<sup>-/-</sup> par rapport à la souris WT. Adapté de Cowling et al., 2014.

Le premier modèle animal de la myopathie myotubulaire fut généré par A. Buj-Bello en 2002, par la délétion d'une large partie de l'exon 4 du gène *Mtm1* (*Mtm1<sup>-y</sup>*) dans la souris de fond génétique B6N (Buj-Bello et al., 2002). Les souris *Mtm1<sup>-y</sup>* reproduisent fidèlement les mêmes phénotypes que ceux observés chez les patients atteints de la XLCNM. Elles présentent des signes d'une faiblesse musculaire qui apparaissent vers 3 semaines et une réduction drastique de la masse musculaire vers 6 semaines (Figure 5). L'aggravation de cette faiblesse musculaire entraîne des difficultés respiratoires et alimentaires aboutissant à la létalité des souris vers l'âge de 7-8 semaines. D'un point de vue histologique, les souris *Mtm1<sup>-y</sup>* sont caractérisées par des fibres anormalement rondes et de très petite taille, une centralisation et une internalisation des noyaux dans 30 à 45% des fibres musculaires et un élargissement de l'espace extracellulaire entre les fibres, reproduisant fidèlement les phénotypes typiques observés sur les coupes histologiques de patients atteints de la XLCNM. Par ailleurs, des défauts de localisation des mitochondries qui s'accumulent dans la zone périnucléaire, dans la région centrale des fibres, une désorganisation générale de la forme et de la taille des mitochondries, des défauts d'alignement des myofibrilles ainsi qu'une réduction du nombre de triades sont observés chez les souris *Mtm1<sup>-y</sup>* (Figure 5). Ces souris ont également des défauts dans la jonction neuromusculaire, caractérisée par une réduction du nombre d'invaginations (Buj-Bello et al., 2002; Dowling et al., 2012). Les phénotypes décrits ci-dessus ont été reproduits fidèlement dans les modèles de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* dont l'expression du gène *Mtm1* est inhibée de manière conditionnelle, sous le contrôle d'un promoteur spécifique du muscle squelettique ( $\alpha$ -actine) (Buj-Bello et al., 2002).

En plus des modèles murins, d'autres animaux modèles de la myopathie myotubulaire ont été générés. Le modèle du poisson-zèbre (zebrafish) de XLCNM fut généré en 2009 par Dowling en utilisant des morpholinos afin de réduire l'expression de la myotubularine (MTM MO) (Dowling et al., 2009). Ces MTM MO reproduisent les défauts observés chez les patients et dans les modèles murins, avec des défauts moteurs très sévères dès le stade embryonnaire, une hypotrophie des fibres musculaire, une centralisation et une internalisation des noyaux et un élargissement de l'espace entre les fibres musculaires. Ces défauts histologiques sont également accompagnés de défauts structuraux majeurs avec notamment une désorganisation générale des réseaux des tubules-T et de l'appareil sarcotubulaire (Dowling et al., 2009). Il existe également le modèle canin de la myopathie myotubulaire. Chez les chiens Labrador Retriever, la XLCNM survient de manière spontanée (MTM1 p.N155K). Ces chiens ont été croisés avec les beagles et

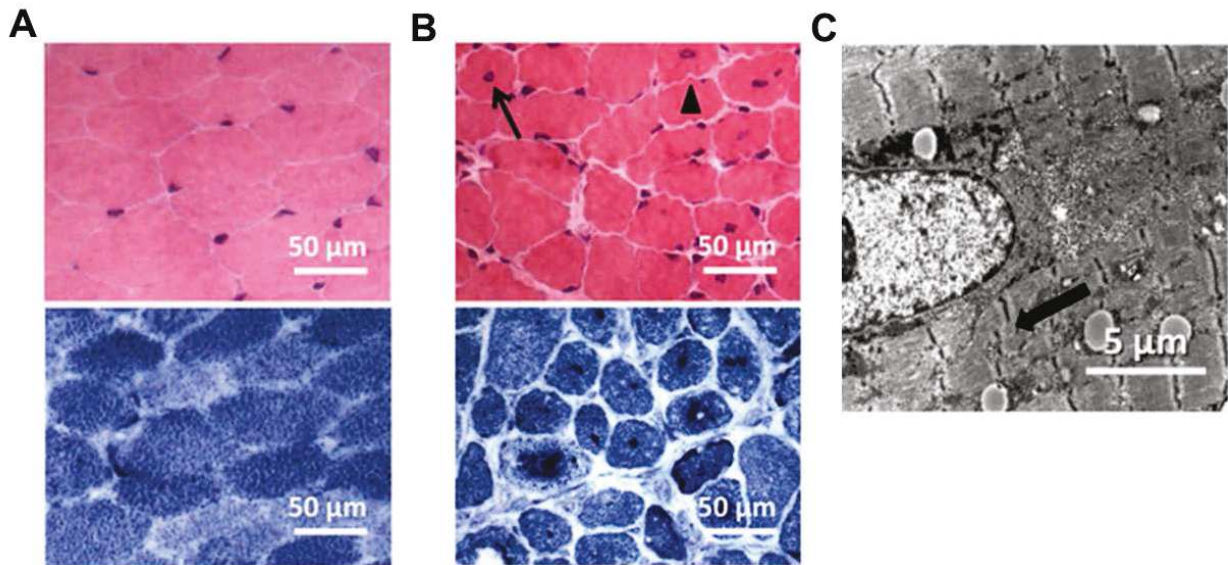
sont actuellement utilisés dans les études cliniques. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent à l'âge de 8 semaines et évoluent progressivement vers une faiblesse musculaire et une réduction de l'activité physique. L'histologie des fibres musculaire de ces chiens se caractérise par une hypotrophie des fibres et une internalisation des noyaux. L'analyse ultra-structurale montre une désorganisation générale de l'appareil sarcotubulaire (Beggs et al., 2010). Enfin, le modèle de la Drosophile est utilisé afin d'étudier la fonction et l'activité de MTM1. Ribeiro *et al.* (2011) ont montré que la suppression de l'expression de *mtm* dans le muscle de Drosophile entraîne des défauts similaires à ceux observés chez les patients atteints de la XLCNM, avec notamment des défauts de développement, des défauts moteurs avec des Drosophiles incapables de voler. De plus, les fibres musculaires de ces Drosophiles sont caractérisées par une accumulation anormale de l'intégrine  $\beta 1$  au centre des fibres, suggérant des défauts dans le recyclage de l'intégrine en absence de MTM1 (Ribeiro et al., 2011).

Comme je l'ai décrit dans les paragraphes précédents, la myopathie centronucléaire liée au chromosome X est due aux mutations du gène *MTM1*, localisé sur le chromosome X et par conséquent, cette pathologie est plus commune et sévère chez les garçons. En revanche, les autres CNMs sont causées par les mutations des gènes présents sur les chromosomes autosomiques et sont classées par conséquence comme des myopathies autosomiques récessives ou autosomiques dominantes. Deux principaux gènes sont associés à ces myopathies : le gène *BIN1* (OMIM#601248) et *DNM2* (OMIM#602378).

## **2.4 La myopathie centronucléaire autosomique liée à BIN1**

### **2.4.1 La myopathie centronucléaire autosomique récessive (ARCNM)**

La myopathie centronucléaire autosomique récessive est associée à des mutations homozygotes, à transmission autosomique récessive, sur le gène *BIN1* (Nicot et al., 2007) (OMIM #255200). Cette myopathie est caractérisée par l'apparition d'une faiblesse musculaire progressive avec une sévérité intermédiaire entre la myopathie centronucléaire liée au chromosome X et la myopathie autosomique dominante. Les premiers symptômes de la maladie peuvent se manifester dès la naissance ou durant l'enfance, se caractérisant parfois par une difficulté à marcher, à courir



**Figure 6. Caractéristiques histologiques et structurales des muscles de patients atteints de l'ARCNM liée à BIN1.**

(A, B) Coupes histologiques de biopsie musculaire d'un individu sain (A) et d'un patient atteint de l'ARCNM (B), colorées à l'Éosine-Hématoxyline (panel de haut) et à la NADH-TR (panel du bas). Chez l'individu sain, les noyaux sont localisés à la périphérie des fibres musculaires, alors qu'ils sont majoritairement internalisés chez le patient atteint de l'ARCNM, avec une accumulation périnucléaire dense de la NADH-TR. Adapté de Böhm et al., 2013. (C) Microscopie électronique d'une section longitudinale du muscle squelettique d'un patient atteint de l'ARCNM. L'image montre un noyau central entouré d'organites intracellulaires avec des défauts d'alignement de la ligne-Z. Adapté de Böhm et al., 2013.

ou à monter les escaliers. Les caractéristiques de cette pathologie peuvent varier selon les individus, et se manifestent par une faiblesse musculaire faciale, parfois sévère, avec une implication des muscles masticateurs, des anomalies oculaires comme un ptosis et une ophtalmoplégie externe. Les patients souffrent également d'une faiblesse des muscles distaux et/ou proximaux avec une émaciation des membres inférieurs ainsi que des défauts squelettiques tels qu'une scoliose et une arcade palatine haute et arquée. Cette myopathie peut être associée à des difficultés respiratoires bénignes et rarement sévères, ne requérant pas une ventilation artificielle. Enfin, une cardiomyopathie sporadique a été rapportée chez certains patients. En l'absence de complications cardiorespiratoires, le pronostic vital de ces patients n'est pas engagé (Böhm et al., 2010; Jungbluth et al., 2008; Nicot et al., 2007; Romero, 2010; Romero and Bitoun, 2011).

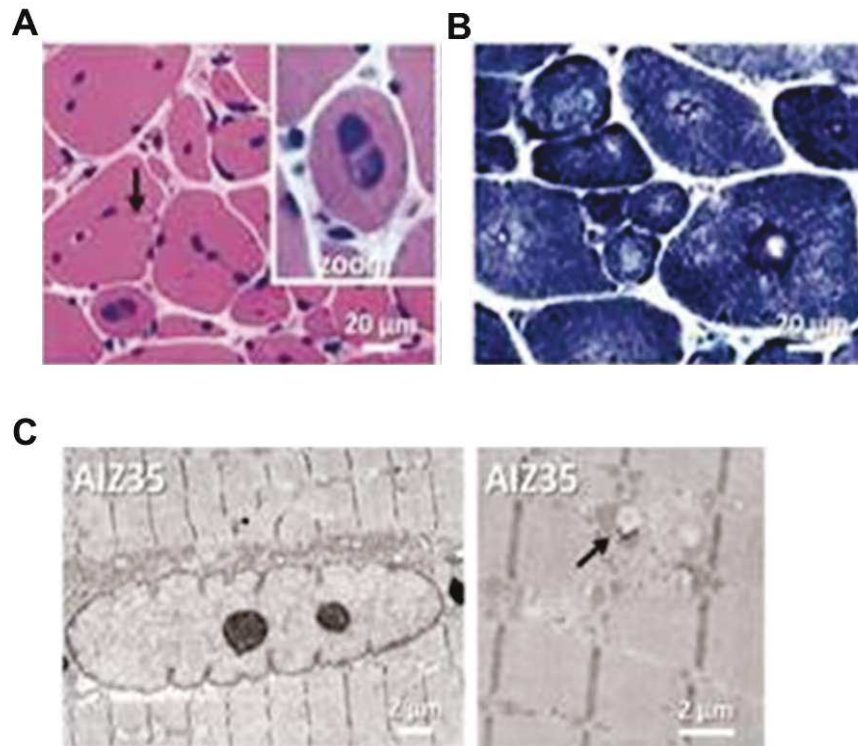
D'un point de vue histologique, les biopsies musculaires de patients atteints de l'ARCNM sont caractérisées par des fibres hypotrophiques arrondies avec des noyaux internalisés, centraux pour la majorité des fibres. Le marquage NADH-TR révèle la présence d'une zone périnucléaire amorphe, dépourvue de matériel contractile, avec une accumulation de mitochondries, du matériel sarcotubulaire (DHPR, RYR1), caveoline-3 et des particules de glycogène, formant un halo autour des noyaux (Figure 6) (Nicot et al., 2007; Romero and Bitoun, 2011). Ces fibres sont par ailleurs caractérisées par une accumulation de tissu conjonctif ainsi qu'un remplacement fibro-adipeux, caractéristiques souvent associées à cette forme de myopathies (Romero, 2010).

#### **2.4.2 Caractérisation du gène impliqué : BIN1**

L'implication du gène bridging integrator-1 (*BIN1*) dans les myopathies centronucléaires a été mise en évidence pour la première fois en 2007 par Nicot *et al.* Grâce au séquençage direct de patients de trois familles consanguines, ils ont pu identifier trois mutations homozygotes sur le gène *BIN1* situé en 2q14.3. Le gène *BIN1* comporte 20 exons, dont certains subissent un épissage alternatif au moment de la transcription, permettant la production de 10 isoformes différentes de *BIN1*, dont une est spécifique du muscle squelettique : *BIN1*-iso8 ( Figure 8) (Nicot et al., 2007).

#### **2.4.3 La myopathie centronucléaire autosomique dominante (ADCNM)**

En plus des mutations homozygotes décrites ci-dessus, d'autres mutations hétérozygotes ont été identifiées sur le gène *BIN1* (avec une transmission à caractère dominant : ADCNM),



**Figure 7. Caractéristiques histologiques et structurales des muscles de patients atteints de l'ADCNM liée à BIN1.**

(A, B) Coupes histologiques de biopsie musculaire d'un patient atteint de l'ADCNM, colorées à l'Éosine-Hématoxyline (A) et à la NADH-TR (B). Le marquage Éosine et Hématoxyline révèle la présence de noyaux centraux alors que le marquage NADH-TR montre une accumulation dense et radiale dans le centre des fibres. Adapté de Böhm et al 2013. (C) Microscopie électronique de sections longitudinales du muscle squelettique d'un patient atteint de l'ADCNM. L'image montre un noyau central entouré d'organites cellulaires et de légers défauts d'alignement des lignes-Z (flèche noire). Adapté de Böhm et al., 2014.

associées à une apparition plus tardive (à l'âge adulte) et moins sévère que l'ARCNM. Ces patients souffrent essentiellement d'une faiblesse musculaire proximale des membres inférieurs, entraînant des difficultés à la locomotion les obligeant à faire usage d'une chaise roulante. Cependant, ils ne présentent ni de faiblesse musculaire faciale, ni d'insuffisance respiratoire, telles qu'observées dans les autres formes. Du point de vue histologique, la principale caractéristique associée à cette forme est la présence de noyaux centraux et des fibres avec une disposition radiale du réticulum sarcoplasmique donnant un aspect en « rayons de roues », ainsi que la présence de vacuoles et des invaginations profondes du sarcolemme vers le centre de la fibre (Figure 7) (Böhm et al., 2014).

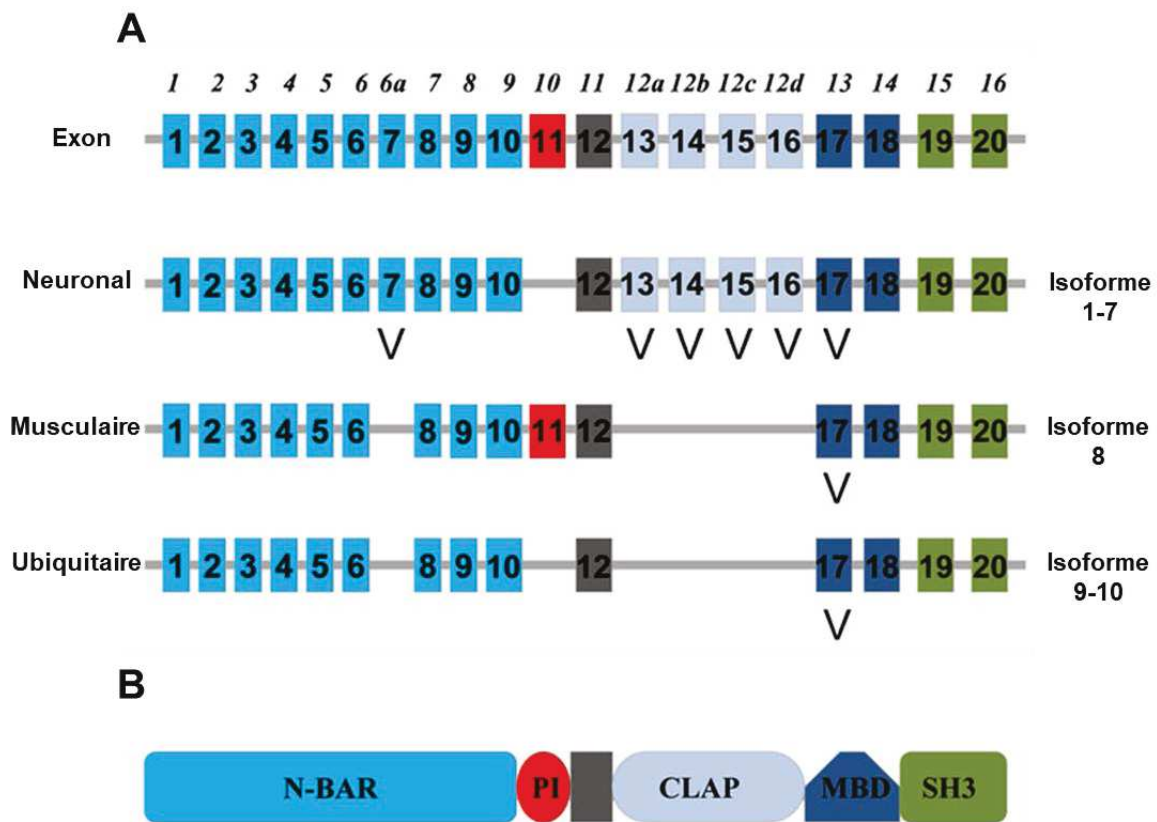
#### **2.4.4 Caractérisation de la protéine BIN1 et fonctions associées**

La protéine codée par le gène *BIN1*, appelée amphiphysine 2 ou BIN1 est d'expression ubiquitaire, avec une expression majoritaire dans le cerveau et dans le muscle squelettique. Plusieurs fonctions cellulaires sont associées à la protéine BIN1.

Il a été montré que BIN1 intervient dans le remodelage membranaire et dans le mécanisme d'endocytose, et assure notamment la biogénèse des tubules-T, structures clés dans le processus de couplage excitation-contraction du muscle squelettique (Lee et al., 2002). Le rôle de BIN1 dans le remodelage membranaire est assuré à la fois par son hélice amphipathique à l'extrémité N-terminale, lui permettant de s'insérer dans la membrane plasmique, et du motif PI (séquence polybasique codée par l'exon 11 spécifique du muscle) assurant la liaison des phosphoinositides avec une grande affinité (Nicot et al., 2007). De plus, le domaine BAR (Bin1/amphiphysin/RVS167) permet de détecter et de stabiliser les courbures membranaires en formant un homodimère (en forme de banane) (Figure 8) (Hohendahl et al., 2016; Nicot et al., 2007; Prokic et al., 2014) (Hohendahl et al., 2016; Nicot et al., 2007; Prokic et al., 2014).

D'autres études ont également montré que le domaine SH3 permet à BIN1 d'interagir avec des protéines à domaines riches en proline, notamment avec la dynamine 2, protéine impliquée dans la fission membranaire (Nicot et al., 2007). Il a été également montré que BIN1 intervient dans la régulation du cytosquelette par le biais de l'interaction du domaine SH3 avec la protéine N-WASP (facteur de nucléation de l'actine) dans les myofibres musculaires, suggérant un rôle pour BIN1 dans la régulation du positionnement des noyaux des fibres musculaires ainsi que dans





**Figure 8. Les différentes isoformes et les domaines protéiques de BIN1.**

(A) L'organisation des différents exons du gène *BIN1* et les différents transcrits (ubiquitaire, neuronal et musculaire). (B) Les domaines protéiques de BIN1 : le domaine Bin/Amphiphysin/Rvs (N-BAR), le motif de liaison aux phosphoinositides (PI), le domaine de liaison à la clathrine et AP2 (CLAP), le domaine de liaison à Myc (MBD) et le domaine d'homologie Src 3 (SH3). Adapté de Prokic et al., 2014.

la formation des triades. Les mutations du domaine SH3 entraînent la perte de cette interaction dans les myopathies centronucléaires (Falcone et al., 2014). Par ailleurs, d'autres études suggèrent également un rôle de BIN1 dans le recyclage et dans le trafic des endosomes (Prokic et al., 2014).

## **2.5 La myopathie centronucléaire autosomique dominante liée à DNM2 (ADCNM)**

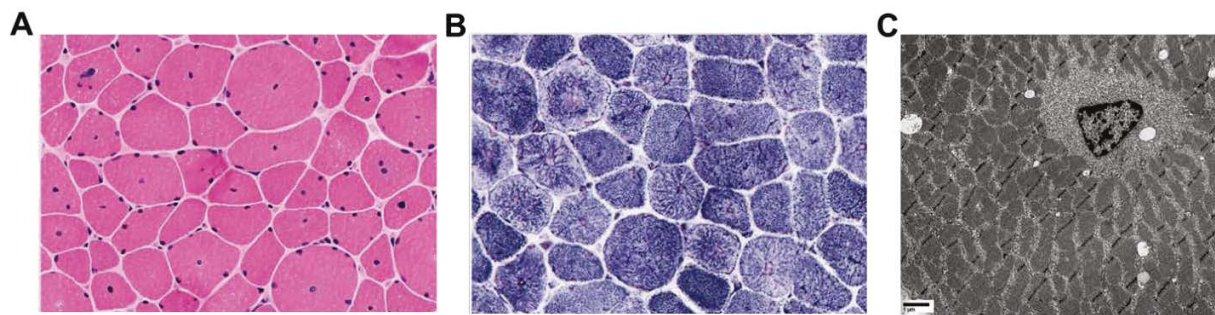
### **2.5.1 Caractéristiques cliniques et histologiques**

La myopathie centronucléaire autosomique dominante liée à DNM2 est une myopathie congénitale caractérisée par une faiblesse musculaire lentement progressive. Cette myopathie apparaît à des âges différents, et entraîne différents niveaux de sévérité. Ainsi, les patients qui développent les premiers symptômes vers l'adolescence ou à l'âge adulte présentent plus souvent des formes bénignes. En revanche, lorsque les symptômes apparaissent durant l'enfance, la myopathie peut être sévère et peut entraîner un recours à l'usage d'une chaise roulante et une assistance médicale. La faiblesse musculaire affecte essentiellement les muscles du tronc, du cou et de la ceinture. Elle peut également être accompagnée d'un léger ptosis et d'une réduction des mouvements oculaires (Romero, 2010; Romero and Bitoun, 2011) (OMIM#160150).

Du point de vue histologique, l'analyse de biopsies musculaires de patients révèle très souvent trois caractéristiques principales associées à cette myopathie : une importante centralisation des noyaux des fibres musculaires, une disposition radiale du réticulum sarcoplasmique lui donnant un aspect en « rayon de roue » très typique de l'ADCNM et une prédominance majeure de fibres musculaires hypotrophiques de type 1. On distingue par ailleurs une agrégation des organites cellulaires dans les espaces internucléaires, tels que les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique, l'appareil de golgi ainsi que des particules de glycogène (Figure 9).

### **2.5.2 Caractérisation du gène impliqué : DNM2**

Plusieurs mutations associées à l'ADCNM ont été identifiées sur le gène *DNM2*. Ce gène comportant 22 exons est situé sur le chromosome 19p13 et code pour une mécano-enzyme appelée



**Figure 9. Caractéristiques histologiques et structurales des muscles de patients atteints de l'ADCNM liée à DNM2.**

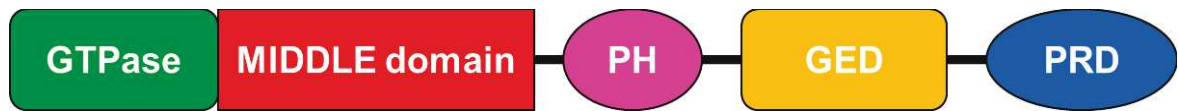
(A) Coupes histologiques d'une biopsie musculaire d'un patient atteint de l'ADCNM, colorée à l'Éosine-Hématoxyline montrant une variation de la taille des fibres musculaires avec une grande proportion de fibres avec des noyaux centraux. (B) Coloration NADH-TR d'une biopsie musculaire d'un patient atteint de l'ADCNM montrant une organisation radiale du réticulum sarcoplasmique, à l'apparence d'un « rayon de roue ». (C) Microscopie électronique d'une section longitudinale du muscle d'un patient atteint de l'ADCNM montrant un noyau central et une organisation radiale du réticulum sarcoplasmique. Adapté de Aghbolaghi & Lechpammer, 2017.

dynamine 2 (DNM2) d'expression ubiquitaire (OMIM#602378). Grâce à l'épissage alternatif, le gène *DNM2* peut coder pour 6 isoformes différentes, dont une isoforme spécifique du muscle comportant un exon supplémentaire (12b) situé entre les exons 12 et 13. L'isoforme comportant l'exon 12b est majoritaire dans le muscle adulte, et son expression est augmentée au cours de la différenciation du muscle squelettique (Cowling et al., 2017). Malgré son expression ubiquitaire, les mutations de *DNM2* affectent uniquement le muscle squelettique (entraînant l'ADCNM) et le système nerveux (entraînant la neuropathie de Charcot Marie Tooth).

### **2.5.3 Caractérisation de la protéine DNM2 et fonctions associées**

La DNM2 appartient à une large famille de GTPases, impliquées dans la régulation de processus clés dans la cellule, notamment l'endocytose, la fission et la tubulation des membranes ainsi que la régulation du cytosquelette. Contrairement aux autres GTPases, les dynamines se distinguent par leur domaine GTPase large, d'où leur classification en tant que « GTPases large », ainsi que par leur capacité à lier des lipides membranaires. De plus, elles sont caractérisées par leur faible affinité pour le GTP et leur capacité à réguler leur activité GTPase par leur auto-oligomérisation, même en l'absence de protéines régulatrices comme les GEFs (Guanine-nucleotide Exchange Factor) dont dépend l'activité des autres GTPases, comme RAC1 (Praefcke and McMahon, 2004).

Les dynamines se composent de 5 domaines protéiques, tous indispensables pour le bon fonctionnement des GTPases : le domaine GTPase, situé à l'extrémité N-terminale, permet de lier et d'hydrolyser le GTP, le domaine intermédiaire ou « middle domain », dont certaines études suggèrent une implication dans la cohésion et la localisation des centrosomes, un domaine d'homologie à pleckstrine (PH) impliqué dans la liaison des phosphoinositides ( $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ) permettant ainsi aux dynamines de se lier à la membrane plasmique, un domaine GED (GTPase effector domain), permettant l'auto-activation des GTPases en interagissant directement avec le domaine GTPase et un domaine riche en proline (PRD) situé à l'extrémité C-terminale, impliqué dans l'interaction des dynamines avec d'autres protéines à domaines SH3 (Figure 10).



**Figure 10. Représentation schématiques des différents domaines protéiques de DNM2.**

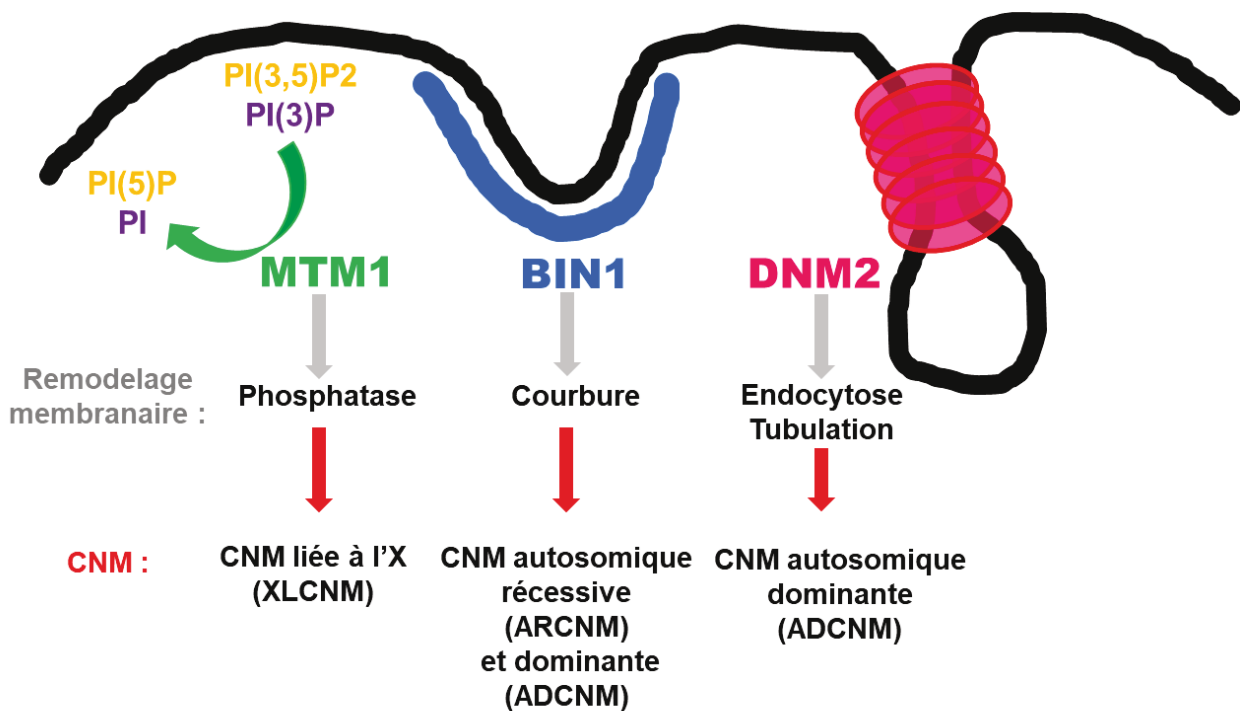
Les domaines protéiques de DNM2 : le domaine GTPase, le domaine intermédiaire (MIDDLE domain), le domaine d'homologie à pleckstrine (PH), le domaine effecteur des GTPases (GED) et le domaine riche en proline (PRD).

## 2.6 Trois protéines, une même voie de signalisation : la voie MAD : la Myotubularine, Amphiphysine 2 et Dynamine 2

Du fait de leurs fonctions cruciales dans le remodelage des membranes ainsi que leur implication dans la physiopathologie des myopathies centronucléaires, mon laboratoire a émis l'hypothèse que les protéines myotubularine (MTM1), Amphiphysine 2 (BIN1) et Dynamine 2 (DNM2) participeraient à une même voie de signalisation (Figure 11), dans laquelle ces trois protéines coopéreraient et interagiraient, par des interactions intramoléculaires ou avec d'autres protéines, afin d'assurer une bonne homéostasie cellulaire. La perte de cette homéostasie serait délétère et à l'origine des CNMs. Cette hypothèse est accentuée notamment par plusieurs travaux de recherche ayant permis d'identifier, au moins en partie, la nature de ces interactions.

Il a été montré que MTM1 et BIN1 interagissent de façon directe et indirecte, et coopèrent pour assurer la tubulation des membranes. Les expériences de co-immunoprécipitation menées par Royer *et al.* (2013) suggèrent une interaction directe entre MTM1 et BIN1 à la fois *in vitro* et dans le muscle squelettique. De plus, grâce à son motif PI, BIN1 est capable de lier les PI et PtdIns5P, produits de la catalyse de PtdIns3P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> par la phosphatase à phosphoinositides MTM1 (Lee *et al.*, 2002), indiquant une interaction indirecte avec MTM1. Cette liaison à MTM1 permet ainsi de recruter BIN1 à la membrane plasmique des cellules. Par ailleurs, Nicot *et al.* (2007) ont montré que la surexpression de BIN1 (l'isoforme musculaire BIN1-exon8) entraîne la tubulation des membranes de plusieurs types cellulaires. Ces travaux soulignent le rôle des protéines MTM1 et BIN1 dans la tubulation des membranes et dans la formation des tubules-T, structures cruciales pour le bon fonctionnement du muscle squelettique (Lee *et al.*, 2002; Nicot *et al.*, 2007).

D'autre part, BIN1 interagit également avec DNM2 et cette interaction requiert le domaine SH3 de BIN1 et le domaine PRD de DNM2. En effet, les mutations du domaine SH3, identifiées par Nicot *et al.* (2007) sur le domaine SH3 de BIN1 chez des patients ARCNM, entraînent une perte de cette interaction et une absence du recrutement de DNM2 à la membrane plasmique des cellules. Cette interaction entre BIN1 et DNM2 semble importante pour la régulation de son activité de fission et de scission membranaire. Il apparaît en effet que DNM2 participerait à la



**Figure 11. Représentation schématique du rôle des protéines MTM1, BIN1 et DNM2 dans le remodelage membranaire et CNMs associées.**

Les protéines MTM1, BIN1 et DNM2 sont toutes impliquées dans le remodelage des membranes et sont toutes mutées dans les myopathies centronucléaires. Les flèches grises indiquent les fonctions assurées par les trois protéines à la membrane plasmique et les flèches rouges indiquent les formes de myopathies centronucléaires (CNM) associées aux mutations de ces trois protéines.

tubulation des membranes par deux mécanismes : elle joue un rôle de protéine chaperonne en formant un polymère hélicoïdal autour de la membrane des tubules permettant leur élongation et la consolidation de leur structure, et, après hydrolyse du GTP, elle assure la fonction de fission de ces tubules permettant la formation de vésicules (Hohendahl et al., 2016). Le maintien de cette balance et la régulation de l'activité de DNM2 seraient assurés par l'action inhibitrice de BIN1 sur DNM2 (Cowling et al., 2017).

L'implication de ces trois protéines, MTM1, BIN1 et DNM2, dans la régulation du remodelage des membranes suggère qu'un déséquilibre d'expression ou des mutations des gènes codant pour ces protéines puissent être délétères pour les cellules. Il a été montré que les mutations identifiées sur le domaine SH3 de BIN1 (K575X et Q573X) entraînent une augmentation de l'interaction de BIN1 avec MTM1 (Royer et al., 2013), en même temps qu'elles diminuent l'interaction de BIN1 avec DNM2 (Nicot et al., 2007). De plus, la surexpression de BIN1 dans les cellules entraîne une augmentation de la tubulation membranaire, processus pouvant être reversé par la surexpression de DNM2 ou des mutants CNM de DNM2 (mutations à gain de fonction) (Gibbs, 2014). Ces études, ainsi que d'autres non citées, nous laissent penser que la perte de l'inhibition de DNM2 assurée par BIN1 entraînerait un déséquilibre entre la fonction de tubulation et de fission des membranes et serait à l'origine, au moins en partie, de la physiopathologie des CNMs. Cette hypothèse est notamment consolidée par les travaux de thérapies croisées menés par mon équipe. Il a été observé que l'expression de DNM2 est significativement augmentée chez des patients XLCNM. La surexpression de DNM2 dans les muscles de souris saines entraîne l'apparition de phénotypes similaires à ceux observés chez les patients ou souris modèles de CNMs (Cowling et al., 2011). A partir de ces observations, il a été suggéré que DNM2 serait à l'origine de ces symptômes. Deux modèles murins ont été générés pour vérifier cette hypothèse : *Mtm1*<sup>-y</sup> *Dnm2*<sup>+/-</sup> et *Bin1*<sup>-/-</sup> *Dnm2*<sup>+/-</sup>, pour lesquels le niveau d'expression de DNM2 a été diminué de moitié. Cette stratégie a permis d'améliorer la survie et les caractéristiques histologiques et phénotypiques de ces souris, consolidant bien l'hypothèse dans laquelle ces trois protéines participeraient à la même voie de signalisation et dans laquelle l'activité et/ou l'expression de DNM2 seraient régulées par l'action inhibitrice de MTM1 et BIN1 (Cowling et al., 2014, 2017).



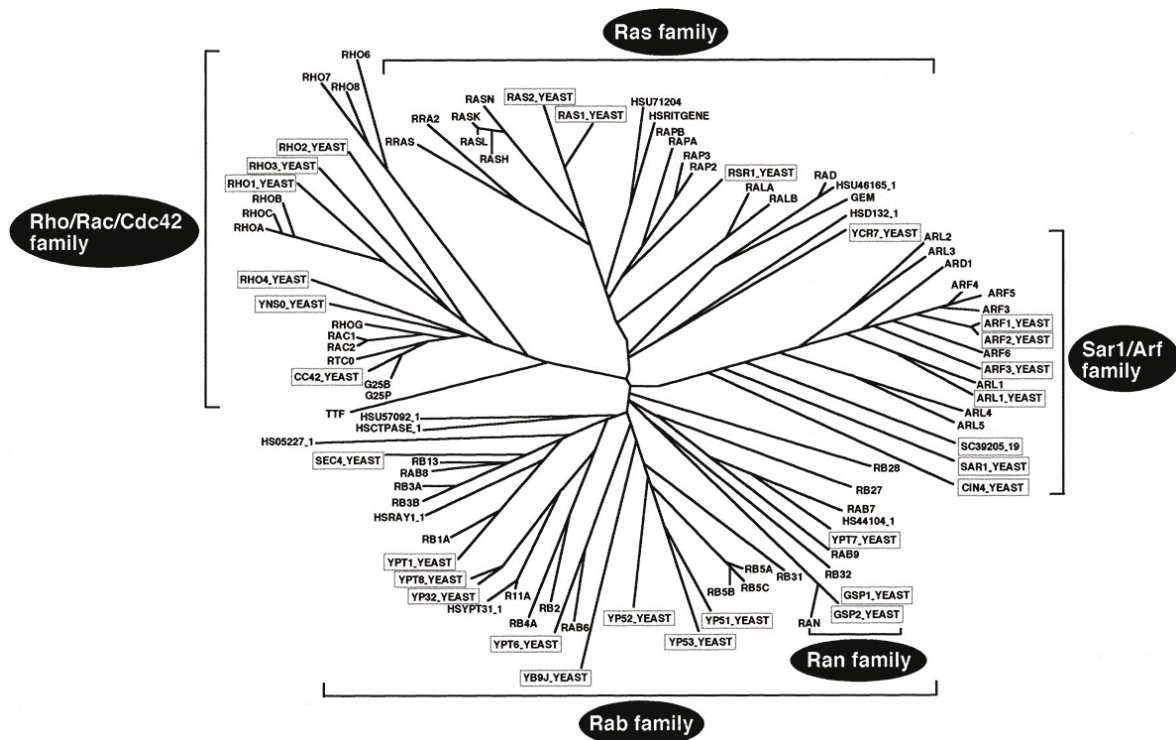
Le remodelage des membranes cellulaires est un processus hautement dynamique et régulé, impliquant plusieurs processus biologiques. Les protéines MTM1, BIN1 et DNM2 sont des acteurs clés dans le remodelage des membranes, impliquant que la dérégulation de leur expression puisse impacter l'homéostasie cellulaire. Les principales caractéristiques histologiques communes aux différentes CNMs consistent en un changement de la taille et de la forme des fibres musculaires, qui deviennent plus petites et arrondies, avec une centralisation et/ou une internalisation des noyaux, qui sont normalement situés à la périphérie des fibres musculaires. Ces anomalies sont évocatrices de défauts de l'organisation du cytosquelette et/ou des adhésions focales. Dans la prochaine partie, je vais décrire les principaux acteurs moléculaires impliqués dans la régulation du cytosquelette, et le rôle de ce dernier dans les processus cellulaires tels que la migration cellulaire et la mécanotransduction.

### **3 Les GTPases de la famille Rho**

#### **3.1 La superfamille Ras : la famille des petites GTPases**

Les Rho-GTPases appartiennent à la superfamille protéique Ras de petites Guanosines Triphosphatases (GTPases), exprimées chez tous les mammifères. Ces GTPases sont conservées au cours de l'évolution, avec des orthologues décrits chez plusieurs espèces notamment la *Drosophile*, *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Dictyostelium* et chez les plantes.

Chez l'humain, la superfamille Ras comprend environ 150 membres classés en 5 familles sur la base d'homologies de séquences, de structures et de fonctions communes : Ras, Rho, Rab, Ran et Arf (Figure 12) (Wennerberg et al., 2005). Ces GTPases sont capables de transmettre des signaux extracellulaires en réponses cellulaires par l'interaction avec plusieurs effecteurs moléculaires permettant l'activation de plusieurs voies de signalisation. Les protéines Ras régulent l'expression des gènes responsables de la prolifération et la différenciation cellulaires, les Rab et Arf sont impliquées dans la régulation du trafic vésiculaire intracellulaire et dans l'endocytose, les Ran sont connues pour leur rôle dans le transport nucléocytoplasmique d'ARN et de protéines ainsi que dans la régulation des microtubules, et les GTPases Rho sont largement connues pour



**Figure 12. Dendrogramme de la famille des petites GTPases de la superfamille Ras.**

Les GTPases de la superfamille Ras regroupent plus de 100 protéines impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires. Elles sont regroupées en 5 familles principales, selon leurs homologies de séquences. Ces 5 familles sont: Ras, Rab, Ran, Rho/Rac/Cdc42 et Sar1/Arf. Adapté de Takai et al, 2001 et Small GTPases (Ras Superfamily) - Jena Bioscience.

leur rôle clé dans le remodelage du cytosquelette d'actine permettant la régulation de la migration, l'adhésion et la polarité cellulaires, ainsi que l'endocytose et l'exocytose.

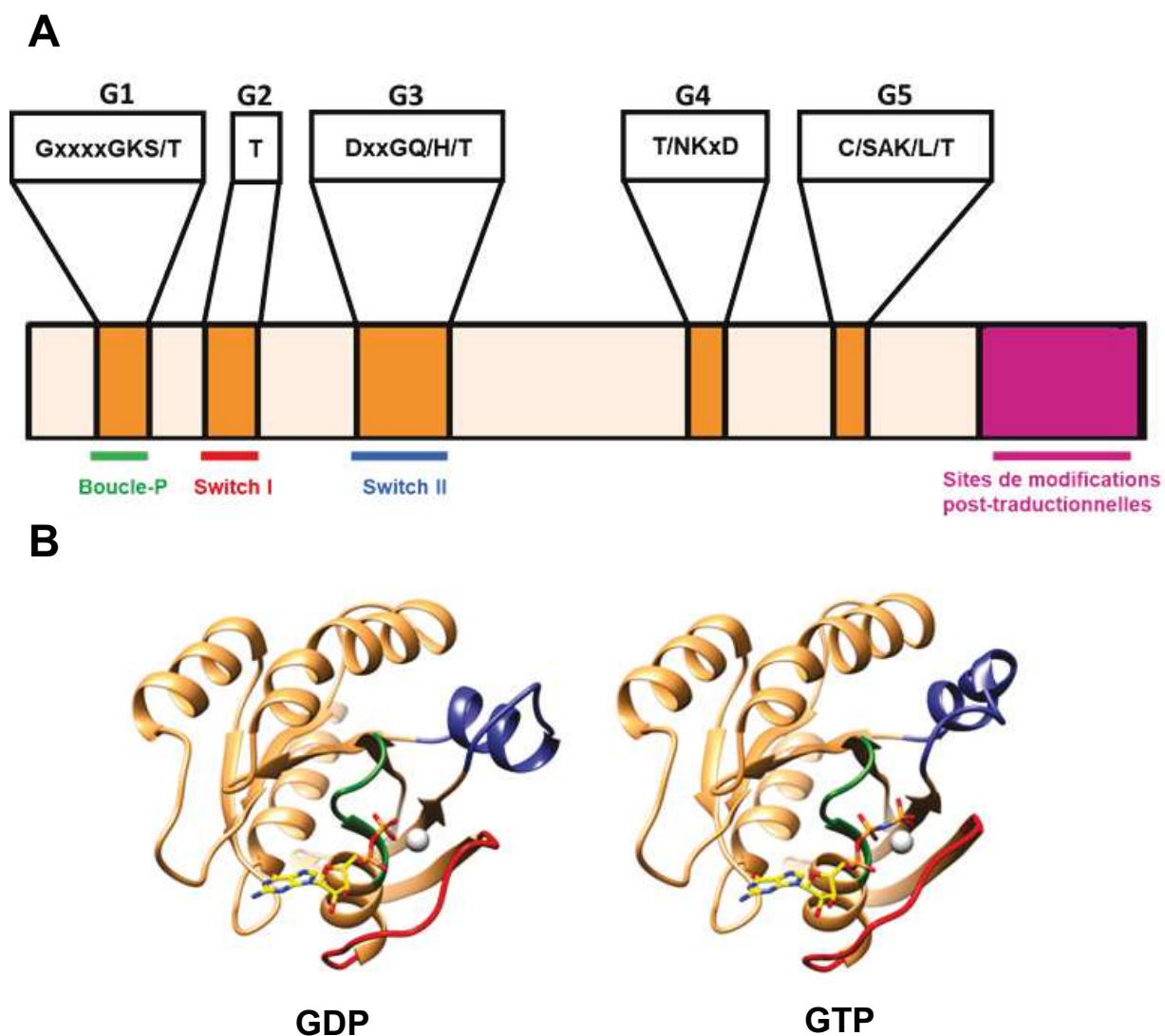
Dans les prochains chapitres, je vais essentiellement me focaliser sur la famille des Rho-GTPases, notamment la GTPase RAC1, sa régulation et son rôle dans la régulation du cytosquelette.

## **3.2 La famille des Rho-GTPases**

Rho ou l'homologue de Ras est la première protéine de la famille des Rho-GTPases à avoir été identifiée, et fut décrite pour la première fois en 1985 (Madaule and Axel, 1985). Depuis, la famille des Rho-GTPases s'est étendue pour inclure 20 protéines classées en 7 sous-familles de Rho-GTPases : Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoD, RhoBTB et RhoH. Les Rho-GTPases les plus étudiées et les mieux caractérisées sont Rho, Rac et Cdc42 (Jaffe and Hall, 2005).

### **3.2.1 Structure des Rho-GTPases**

L'analyse comparative de séquences d'acides aminés de Rho-GTPases de plusieurs espèces a montré qu'elles partagent environ 30 à 55% d'homologie. Ces petites GTPases, de 20 à 25 kDa, possèdent toutes un seul domaine de liaison des nucléotides (le domaine G) dont la structure est hautement conservée de la levure jusqu'aux mammifères (Bourne et al., 1991; Tomafukai and Shimizu, 2019). Ce domaine G permet de catalyser la réaction d'hydrolyse du GTP en GDP. Il est constitué de 6 feuillets  $\beta$  entourés de 5 hélices  $\alpha$  et comporte des motifs, appelés également les « boîtes G », hautement conservés chez la plupart des GTPases de la superfamille Ras. Ces boîtes G consistent en une boucle-P et deux régions flexibles, le Switch I et le Switch II, subissant des changements conformationnels majeurs selon leur liaison au GTP ou au GDP. La boucle-P ou le motif G1 (GxxxxGKS/T) sont responsables de la reconnaissance et de la liaison du groupement phosphate et de l'ion  $Mg^{2+}$  des nucléotides cibles (GTP ou GDP). Le Switch I contient le motif G2 (Thréonine) permettant la liaison du phosphate- $\gamma$  et l'ion  $Mg^{2+}$  du nucléotide cible, alors que le Switch II contenant le motif G3 (DxxGQ/H/T) permet l'hydrolyse du phosphate- $\gamma$  du GTP grâce au résidu glycine. Ces deux régions, Switch I et Switch II changent de conformation suite à l'hydrolyse du GTP en GDP, permettant la liaison à d'autres protéines effectrices. Les



**Figure 13. Structure générale du domaine « G » de la famille des Rho-GTPases.**

(A) La famille des Rho-GTPases est composée d'un domaine « G » organisé en plusieurs domaines, appelés les « boîtes-G » (en orange sur le schéma). La région hypervariable est le site de modifications post-traductionnelles (en rose sur le schéma). (B) Structure cristallographique montrant les changements de conformation d'une GTPase (H-Ras) liée soit au GDP (à gauche) ou au GTP (à droite). Adapté de Kawano et al., 2014 et Toma-Fukai and Shimizu, 2019.

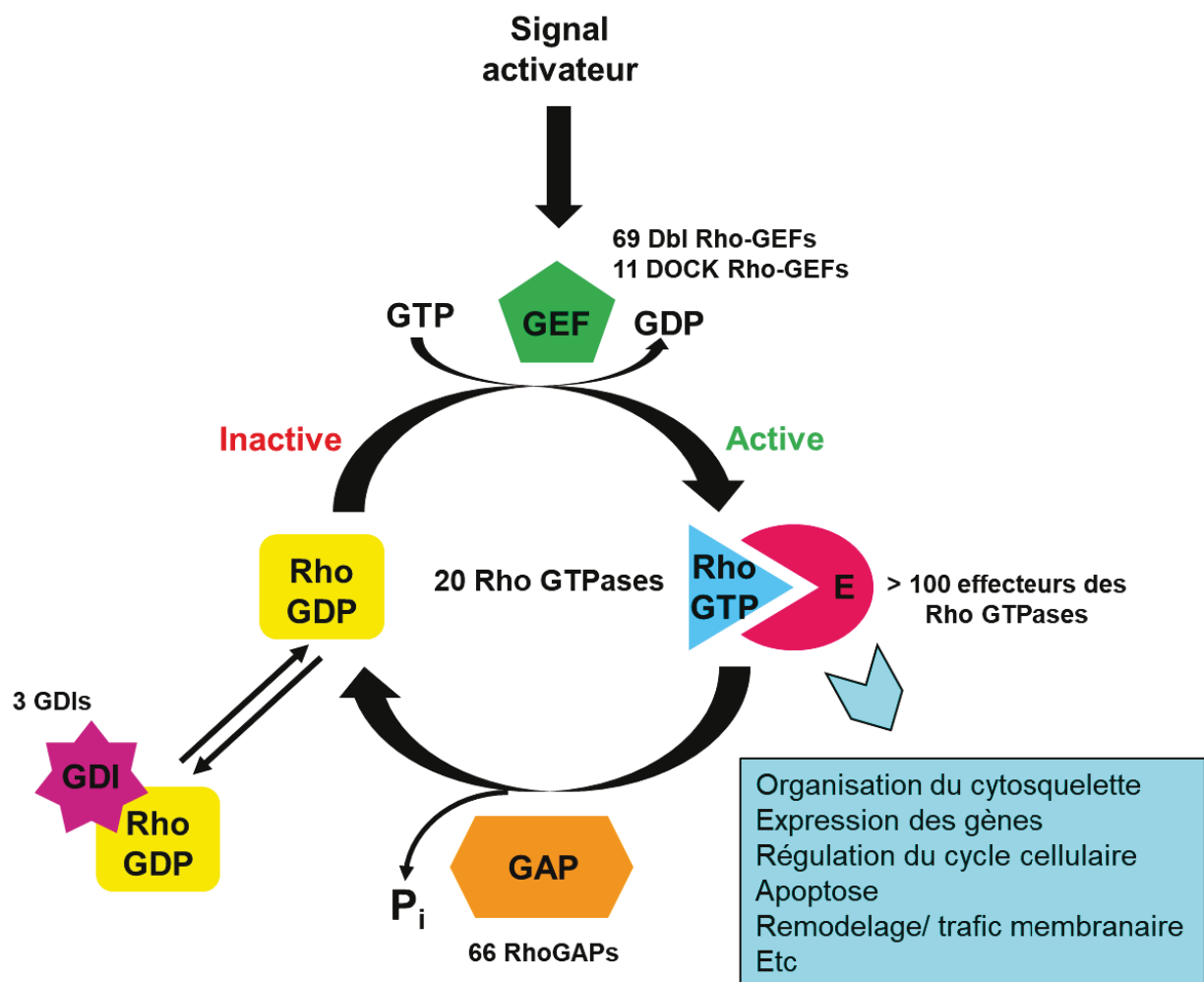
autres motifs, G4 (T/NKxD) et G5 (C/SAK/L/T) établissent des contacts spécifiques avec les bases guanyliques pour les distinguer des autres nucléotides (Figure 13).

### **3.2.2 Le cycle GTP/GDP des Rho-GTPases**

Les petites GTPases de la superfamille Ras sont considérées comme des commutateurs moléculaires majeurs, régulant un large panel de fonctions cellulaires. Elles ont la capacité d'osciller entre une conformation active liée au GTP et une conformation inactive après hydrolyse du GTP en GDP (Bishop and Hall, 2000). Les Rho-GTPases ont une faible activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP en GDP. Trois familles de protéines sont responsables de la régulation de l'état d'activation des Rho-GTPases. Les facteurs d'échange de nucléotide guanylique (GEFs) catalysent la réaction de substitution du GDP en GTP en dissociant le GDP de la Rho-GTPase, favorisant la liaison du GTP. Elles permettent ainsi d'activer la conformation active des GTPases entraînant la liaison à des protéines effectrices en aval (Schmidt and Hall, 2002). Les protéines activatrices des GTPases (GAPs) accélèrent l'activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP en GDP par les Rho-GTPases, à la suite de quoi elles adoptent une conformation inactive lorsqu'elles sont liées au GDP (Bernards, 2003). Le troisième type de régulation est assuré par les inhibiteurs de dissociation des nucléotides guanyliques (GDIs). Ces protéines permettent la séquestration d'une partie des Rho-GTPases à l'état inactif dans le cytosol et les empêchent d'être relocalisées à la membrane plasmique afin d'éviter une réactivation spontanée par les protéines GEFs (Figure 14) (Olofsson, 1999).

A l'état actif, ces commutateurs moléculaires interagissent avec un large panel de cibles moléculaires et de protéines régulatrices comme les kinases et les protéines adaptatrices et régulatrices de l'actine, permettant la transmission de signaux cellulaires et la régulation de fonctions fondamentales, telles que le réarrangement du cytosquelette, la motilité et la polarité cellulaires, le trafic vésiculaire et membranaire et bien d'autres fonctions essentielles à l'homéostasie cellulaire. La régulation spatiotemporelle de chacune de ces Rho-GTPases est ainsi essentielle pour définir leurs localisations et fonctions cellulaires associées (Bishop and Hall, 2000; Bos et al., 2009; Hodge and Ridley, 2016).

### **3.3 La GTPase RAC1 : son expression et sa régulation**



**Figure 14. Cycle de régulation des Rho-GTPases.**

La famille des Rho-GTPases est composée de 20 protéines chez l'humain. La majorité des Rho-GTPases oscillent entre une forme active lorsqu'elles sont liées au GTP et une forme inactive lorsqu'elles sont liées au GDP. La régulation de ces deux états d'activation est assurée par les facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEFs), qui catalysent la réaction d'échange du GDP en GTP, et les GAPs qui catalysent la réaction d'hydrolyse du GTP en GDP. À l'état actif, les Rho-GTPases activent plusieurs effecteurs et régulent plusieurs fonctions cellulaires. Les GDI séquestrent les Rho-GTPases dans le cytosol afin d'éviter leur réactivation spontanée. Adapté de Cook et al., 2016.

### **3.3.1 L'expression de RAC1**

Chez les mammifères, les RACs constituent une sous famille de petites GTPases appartenant à la famille des Rho-GTPases. RAC1 fut découverte pour la première fois en tant que substrat de la toxine botulique, en 1989 (Didsbury et al., 1989). Il existe trois isoformes de la protéine RAC, codées par trois gènes différents : RAC1 et RAC3 dont l'expression est ubiquitaire et RAC2 dont l'expression est prédominante dans les cellules hématopoïétiques. Ces trois isoformes partagent 89 à 93% d'identité dans leurs séquences d'acides aminés et diffèrent principalement par 15 résidus au niveau de l'extrémité C-terminale. Malgré leur homologie de séquences, certaines études suggèrent que ces trois RACs n'ont pas de redondance fonctionnelle. Il a été montré que la délétion du gène codant pour RAC1 entraîne la létalité des souris à un stade précoce de la vie embryonnaire, alors que la délétion des gènes codant pour RAC2 et RAC3 n'est pas létale, bien qu'elle entraîne des défauts fonctionnels spécifiques de certains types cellulaires (Heasman and Ridley, 2008).

### **3.3.2 La régulation de RAC1 par les GEFs TIAM**

Tout comme les autres Rho-GTPases, RAC1 oscille entre une conformation active liée au GTP et une conformation inactive liée au GDP. En réponse à des stimuli extracellulaires, l'interconversion entre ces deux états conformationnels est assurée par les protéines GEFs, GAPs et GDIs. Les GEFs permettent la dissociation du GDP et facilitent la liaison du GTP à RAC1, entraînant son activation (Marei and Malliri, 2017). Il a été montré que pour être activée, RAC1 nécessite d'être localisée à la membrane plasmique (Schmidt and Hall, 2002).

#### **3.3.2.1 TIAM : une GEF de la famille Dbl**

Il existe environ 80 GEFs régulatrices des Rho-GTPases chez l'humain. Ces GEFs sont réparties en deux familles selon le domaine catalytique qui les compose : les GEFs de la famille Dbl (Diffuse B-cell Lymphoma), comprenant 69 membres protéiques et les GEFs de la famille DOCK (Dedicator of Cytokinesis), composée de 11 protéines (Figure 14). La famille Dbl est caractérisée par la présence du domaine catalytique Dbl homologue (DH) associé à un domaine d'homologie à pleckstrine (PH). Ces deux domaines composent la plus petite unité catalytique caractérisant cette famille de GEFs, requise pour la catalyse des réactions d'échange de GDP en

GTP, *in vivo*. Ce domaine DH-PH est souvent flanqué par plusieurs domaines protéiques. Ces domaines protéiques assurent la régulation de la GEF, souvent par des interactions intramoléculaires ou par la liaison à d'autres protéines ou lipides. Ils assurent également la localisation membranaire des GEFs par la liaison aux lipides membranaires et participent à la régulation de leur activité intrinsèque (Goedhart and van Unen, 2019; Goicoechea et al., 2014; Wennerberg et al., 2005b).

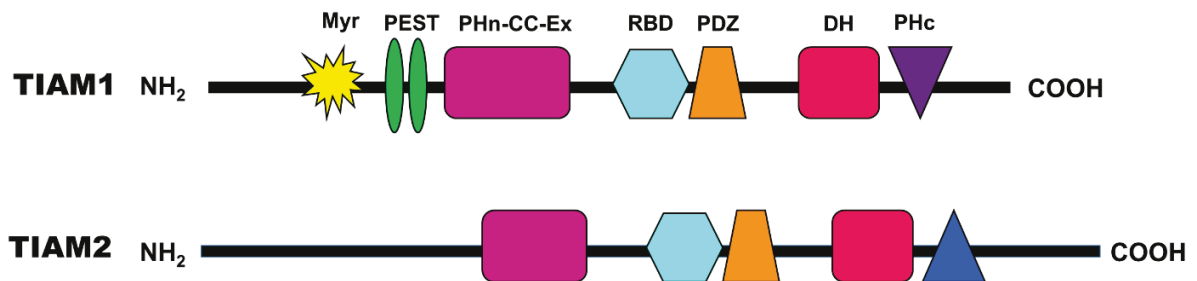
À ce jour, plus d'une vingtaine de Rho-GEFs de RAC1 ont été identifiées, certaines étant plus spécifiques que d'autres. La GTPase RAC1 est régulée notamment par la famille de protéines T-lymphoma invasion and metastasis (TIAM). Les TIAMs de la famille Dbl régulent spécifiquement l'activité de RAC1 et représentent l'une des familles de GEFs les plus étudiées et les mieux caractérisées à ce jour (Abdrabou and Wang, 2018; Cook et al., 2016; Rossman et al., 2005).

### **3.3.2.2 L'expression des GEFs TIAM**

La protéine TIAM1 fut identifiée en 1994 lors de la recherche *in vitro* de gènes conférant un phénotype invasif aux cellules de lymphome-T murin (Habets, 1994; Michiels, 1995). La famille de GEFs TIAM est composée de deux isoformes codées par deux gènes : TIAM1 et TIAM2, appelée également Sif-Tiam1-like exchange factor (STEF), identifiée en 1999 (Chiu et al., 1999; Hoshino et al., 1999). Alors que l'expression de TIAM1 est ubiquitaire, avec une prédominance d'expression au niveau du cerveau, des testicules et de l'épiderme, TIAM2 est exprimée essentiellement dans les cellules neuronales (Goto, 2011; Rooney et al., 2010). La séquence protéique de TIAM1 est hautement conservée chez les vertébrés et présente une homologie de séquence d'environ 95% entre l'humain et la souris. Chez l'humain, le gène codant pour la protéine TIAM1 est situé sur le chromosome 21q22.1. Les expériences de délétion totale du gène *Tiam1* chez la souris ont entraîné des défauts sévères du développement embryonnaire du cerveau, indiquant le rôle primordial de cette protéine au cours de l'embryogénèse (Boissier and Huynh-Do, 2014; Minard et al., 2004).

### **3.3.2.3 La structure protéique des GEFs TIAM**





**Figure 15. Les domaines protéiques de TIAM1 et TIAM2.**

La protéine TIAM1 comporte plusieurs domaines protéiques: Myr (motif de myristoylation) et le domaine PEST, tous deux impliqués dans la régulation de la stabilité de la protéine TIAM1, les domaines PHn (le domaine PH de l'extrémité N-terminale), CC (la région coiled coil) et Ex (le domaine extended) forment le domaine PH-CC-Ex impliqué dans la localisation de TIAM1/2 à la membrane plasmique, le domaine RBD (Ras-binding domain), le domaine PDZ (PSD-95/DlgA/ZO-1), le domaine DH (Dbl homology) impliqué dans la fonction d'échange guanylique de TIAM1/2 et le domaine PHc (PH de l'extrémité C-terminale). La protéine TIAM2 partage une forte homologie de séquences avec la protéine TIAM1, mais ne comporte pas de domaines Myr et PEST. Adapté de Boissier & Huynh-Do, 2014 et Miller, 2014.

La protéine TIAM1 est un polypeptide d'environ 1591 acides aminés, mesurant environ 177 kDa, alors que son homologue TIAM2 est composée de 1714 acides aminés et possède un poids moléculaire d'environ 190 kDa. Les protéines de la famille TIAM sont composées de plusieurs domaines protéiques assurant des fonctions régulatrices et d'un domaine catalytique DH-PH, catalysant les réactions d'échange nucléotidique de la GTPase RAC1. Il a été montré que les protéines TIAM1 et TIAM2 partagent une forte homologie de séquences, avec certains domaines ayant environ 70% d'homologie (Chiu et al., 1999; Hoshino et al., 1999).

Les protéines TIAM sont caractérisées par la présence de deux domaines d'homologie à Pleckstrine (PH). En plus d'avoir un domaine PH au niveau de la sous-unité catalytique, à l'extrémité C-terminale (PHc), il existe un second domaine PH à l'extrémité N-terminale (PHn). Il a été suggéré que le rôle du domaine PHn consiste à lier avec une forte affinité les phosphoinositides membranaires, permettant la translocation de TIAM vers la membrane plasmique. Le domaine PHn est subordonné à un domaine Coiled-Coil (CC) et un motif adjacent Ex (CC-EX). Le module PHn-CC-Ex assure des fonctions régulatrices de la protéine TIAM ainsi que sa localisation membranaire. Par ailleurs, TIAM comporte un domaine de liaison de Ras (RBD) et un domaine PSD-95/discs large/zonula occludens-1 (PDZ) permettant la liaison des protéines d'adhésion cellulaire, notamment les protéines du cytosquelette. Le domaine catalytique DH-PH est situé à l'extrémité N-terminale des protéines TIAM1 et TIAM2. TIAM1 possède en plus un motif de myristoylation (glycine en position 2) à l'extrémité N-terminale, impliqué dans la stabilisation de la protéine à la membrane plasmique, ainsi que deux domaines PEST (séquence peptidique riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine) dont la fonction serait de réguler le renouvellement de la protéine TIAM1, par son adressage au protéasome (Figure 15) (Boissier and Huynh-Do, 2014; Minard et al., 2004).

#### **3.3.2.4 La régulation des GEFs TIAM**

La régulation de l'activité GEF de la famille TIAM est un mécanisme complexe faisant intervenir des interactions intra et intermoléculaires. L'activation des protéines TIAM implique le plus souvent une levée de l'auto-inhibition moléculaire, des changements de la localisation intracellulaire, des modifications post-traductionnelles et des interactions avec plusieurs messagers lipidiques ou des protéines intracellulaires (Mertens et al., 2003).

### ✓ *Régulation par des interactions intramoléculaires*

L'un des mécanismes de régulation des protéines TIAM1 repose sur des interactions intramoléculaires entre les domaines protéiques régulateurs présents à l'extrémité N-terminale et le domaine catalytique DH-PH. Ces interactions intramoléculaires entraînent une auto-inhibition de TIAM1 (Xu et al., 2017). Michiels *et al.* (1997) ont montré que la suppression ou la modification de la séquence peptidique de l'extrémité N-terminale de TIAM1 entraîne une augmentation de son activité GEF associée à une translocation membranaire de TIAM1. Ces mêmes observations ont été faites sur le mutant TIAM1-C1199, tronqué au niveau de son extrémité N-terminale.

La protéine TIAM1 comporte deux domaines PEST et un motif de myristoylation au niveau de son extrémité N-terminale. Les domaines PEST sont généralement connus pour leur rôle dans l'adressage des protéines à la machinerie de dégradation. Il a été montré que la modification des domaines PEST présents à l'extrémité C-terminale de la GEF proto-Dbl entraîne une augmentation son activité GEF et une translocation à la membrane plasmique, *in vivo* (Vanni et al., 2002). Ces domaines PEST permettraient donc d'assurer le renouvellement de la protéine TIAM1 par son adressage à la machinerie de dégradation après activation de RAC1. Cela suggère que la délétion des domaines PEST peut contribuer à l'augmentation de la stabilité et l'activité GEF de TIAM1. Par ailleurs, le motif de myristoylation présent à l'extrémité N-terminale de TIAM1 semble participer à la stabilisation de TIAM1 au niveau de la membrane plasmique, mais ne peut à lui seul assurer sa relocalisation membranaire. En effet, Michiels *et al.* (1997) ont montré que le motif de myristoylation ne peut pas assurer l'adressage d'une protéine TIAM1 tronquée, dont le motif PHn est supprimé, à la membrane plasmique.

À l'état basal, la protéine TIAM1 est principalement localisée dans le cytoplasme. En réponse à des stimuli, elle se relocalise au niveau de la membrane plasmique. Cette relocalisation membranaire serait un prérequis pour que TIAM1 exerce sa fonction d'échange guanylique de la GTPase RAC1 et permette la formation de protubérances membranaires (Michiels et al., 1997). Cette relocalisation membranaire semble dépendante du module PHn-CC-Ex. En effet, la suppression des domaines PHn, CC ou Ex entraîne la perte de la relocalisation membranaire de TIAM1, indiquant l'importance de tout le module PHn-CC-Ex dans cette relocalisation (Michiels et al., 1997).

### ✓ *Régulation par liaison aux phosphoinositides membranaires*

Les domaines PH sont des domaines de liaison des phosphoinositides membranaires, permettant la localisation et l'ancrage des protéines à la membrane plasmique. Les phosphoinositides comme les phosphatidylinositol diphosphate  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  et le  $\text{PtdIns}(3,4)P_2$  et le phosphatidylinositol triphosphate ( $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ ) jouent un rôle crucial dans la régulation de l'activité GEF des Rho-GTPases et interviennent dans les mécanismes d'adhésion et de migration cellulaires à travers la régulation du réarrangement du cytosquelette d'actine. TIAM et Ras-GRF1/2 sont les seules familles de GEFs des Rho-GTPases à avoir un deuxième domaine PHn en plus du domaine PHc de la sous-unité catalytique. La présence de ces deux domaines est requise pour le bon fonctionnement de TIAM, en revanche, seul le domaine PHn est impliqué dans l'adressage de TIAM1 à la membrane plasmique. Le domaine PHn assure en effet la liaison des PI membranaires, notamment le  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$ ,  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  et le  $\text{PtdIns}(3,4)P_2$ , avec une forte affinité. Quant au domaine PHc, bien qu'ayant une très faible affinité pour les PI, il lie essentiellement le  $\text{PtdIns}3P$  (Snyder et al., 2001). Par ailleurs, Viaud *et al.* ont montré que le domaine DH-PH lie également le  $\text{PtdIns}5P$ , qui est le produit de la catalyse de  $\text{PtdIns}(3,5)P_2$  par MTM1 (Viaud et al., 2014). Certaines études suggèrent que l'augmentation de l'activité GEF du mutant tronqué TIAM1-C1199 n'est pas seulement liée à l'augmentation de sa stabilité. La prédominance de TIAM1-C1199 à la membrane plasmique permettrait à son domaine catalytique DH-PH d'être à proximité des phosphoinositides qui augmenteraient son activité d'échange nucléotidique de RAC1. En effet, Viaud *et al.* ont montré que la liaison du  $\text{PtdIns}5P$  par TIAM1 entraîne une augmentation de l'activité du domaine DH-PH, notamment lorsque RAC1 est présente dans un environnement enrichi en  $\text{PtdIns}5P$  (Viaud et al., 2014).

### ✓ *Régulation par la liaison à d'autres protéines*

En plus d'assurer la liaison avec les PI, les domaines protéiques de l'extrémité N-terminale des protéines TIAM permettent d'établir des interactions avec une multitude de protéines intracellulaires. Ces interactions intermoléculaires assurent la régulation de l'activité d'échange nucléotidique des protéines TIAM. Parmi les différents partenaires protéiques de TIAM1, certains sont impliqués dans la régulation directe de l'organisation du cytosquelette d'actine. Il a été montré que TIAM1 interagit avec p21-Arc, une sous-unité du complexe Arp2/3. Ce complexe est connu pour son rôle dans la nucléation de nouveaux filaments d'actine. La liaison entre le complexe

Arp2/3 et TIAM1 a lieu au niveau des domaines PHn et CC de l'extrémité N-terminale de TIAM1. Cette étude a montré que TIAM1 et Arp2/3 co-localisent au niveau des sites de nucléation de l'actine, notamment au niveau des protubérances cellulaires. Par ailleurs, les chercheurs ont mis en évidence une boucle d'« auto-amplification » dans laquelle le complexe Arp2/3 régule la localisation et l'activité GEF de TIAM1 requises pour l'activation de RAC1, qui à son tour permet de recruter Arp2/3 au niveau des sites de polymérisation de l'actine, assurant ainsi la régulation des changements morphologiques tels que la formation de protubérances cellulaires ou les lamellipodes requis dans les processus d'adhésion et migration cellulaires (Ten Klooster et al., 2006).

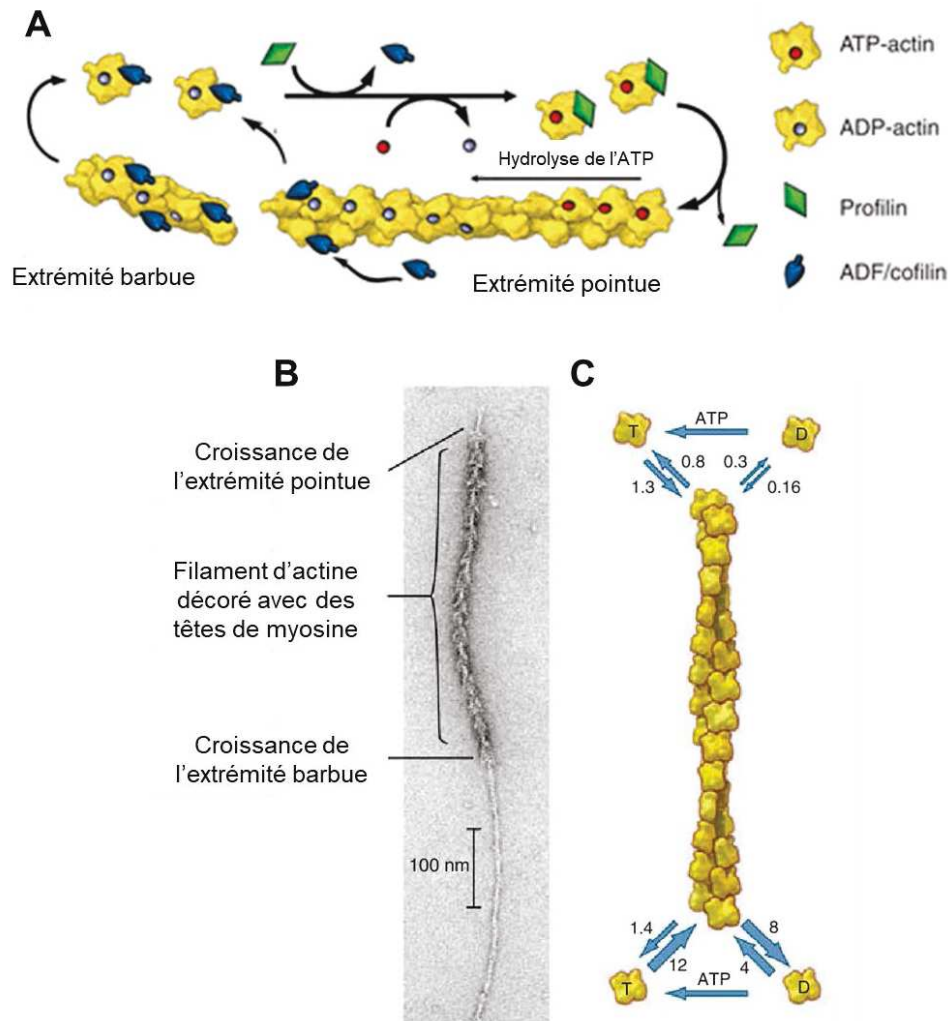
Dans une autre étude, il a été montré que TIAM1 lie un autre partenaire protéique impliqué lui aussi dans la régulation de l'adhésion et migration cellulaires, médiée par les intégrines (Wang et al., 2012). Il s'agit de taline, une protéine du cytosquelette qui lie et active les intégrines, permettant de déclencher les voies de signalisation, notamment via PAR (Protease-Activated Receptors), impliqués dans la motilité cellulaire. Les auteurs ont montré que la liaison des protéines TIAM1 et taline se fait au niveau de la région centrale de TIAM1, notamment grâce aux domaines RBD, PDZ et DH, et co-localisent au niveau des adhésions cellulaires. Dans cette étude, les auteurs proposent un modèle de régulation dans lequel TIAM1, en association avec taline et le complexe PAR, interagit avec les intégrines, permettant la régulation à la fois de l'activité de RAC1 et le recyclage des adhésions focales requis pour la migration polarisée des cellules (Wang et al., 2012).

## **4 La régulation du cytosquelette par la GTPase RAC1**

### **4.1 Le cytosquelette d'actine : expression et dynamique de l'actine**

#### **4.1.1 Expression de l'actine**

Le cytosquelette est une structure dynamique et un réseau composé de protéines filamenteuses et des protéines de régulation. Le cytosquelette confère la force mécanique



**Figure 16. La polymérisation de l'actine.**

(A) La polymérisation de l'actine se fait préférentiellement à l'extrémité barbue (dite +) à partir des complexes actine-ATP-profiline. Après l'incorporation du monomère d'actine dans le filament naissant, la profiline se dissocie. La polymérisation entraîne l'hydrolyse de l'ATP en ADP et le relargage d'un phosphate inorganique. Les protéines ADF/cofiline entraînent la dépolymérisation du filament d'actine au niveau de l'extrémité pointue, comportant les polymères d'actine liés à l'ADP. Adapté de Svitkina et al, 2018. (B) Micrographie électronique d'un filament d'actine montrant l'extrémité barbue (en bas) à croissance rapide et l'extrémité pointue (en haut), à croissance lente. (C) Diagramme montrant les vitesses d'association et de dissociation de l'actine aux deux extrémités du filament d'actine. L'extrémité pointue est en haut, et l'extrémité barbue est en bas. L'unité de la constante du taux d'association est en  $\mu\text{m}^{-1} \text{sec}^{-1}$  et l'unité de la constante du taux de dissociation est en  $\text{sec}^{-1}$ . Adapté de Pollard, 2016.

nécessaire aux processus cellulaires, tels que la motilité, l'organisation des organites intracellulaires et la forme des cellules (Fletcher and Mullins, 2010).

L'actine est l'une des trois protéines majeures du cytosquelette. Elle est également la protéine la plus abondamment exprimée dans les cellules, représentant environ 10% des protéines totales. Cette protéine est hautement conservée au cours de l'évolution, des procaryotes aux eucaryotes. Cette haute conservation est liée à son rôle en tant que protéine structurale majeure, assurant des fonctions diverses telles que la motilité, l'adhésion et la polarité cellulaire ainsi que la localisation des différents organites intracellulaires. Tous les eucaryotes possèdent au moins un ou plusieurs gènes codant pour l'actine. Chez l'humain, il existe trois isoformes de l'actine : l' $\alpha$ -actine, exprimée dans les muscles (squelettiques, lisses et cardiaques), la  $\beta$ -actine exprimée dans les cellules non musculaires, et la  $\gamma$ -actine exprimée dans certains muscles lisses et dans les cellules non musculaires (Pollard, 2017). Ces isoformes diffèrent par quelques acides aminés de la région N-terminale de l'actine.

#### **4.1.2 La dynamique de l'actine : le tapis roulant « treadmilling »**

L'actine est une protéine globulaire d'un poids moléculaire de 43kDa, appelée l'actine-G. Elle est présente dans le cytosol couplée soit à l'ADP (Actine-G/ADP) ou couplée à l'ATP (actine-G/ATP). Cette actine-G est capable de se polymériser et de former une structure hélicoïdale en double hélice, appelée l'actine-filamenteuse (actine-F). Le polymère d'actine-F est caractérisé par la présence de deux extrémités : une extrémité « plus » appelée également « extrémité barbue » caractérisée par une croissance rapide du filament d'actine, et une extrémité « moins » ou « pointue » caractérisée par une croissance lente (Figure 16). En d'autres termes, au niveau de l'extrémité « plus », a lieu l'incorporation de nouveaux monomères d'actines-G/ATP, permettant l'accroissement et la polymérisation du filament d'actine. L'ATP est ensuite hydrolysée en ADP et permet au monomère de l'actine-G de se décaler le long du filament d'actine en direction de l'extrémité pointue. Arrivés à l'extrémité pointue, les monomères de l'actine-G/ADP se détachent du filament d'actine, permettant la dépolymérisation de l'actine-F. Une fois détachés du filament d'actine, les monomères d'actine-G/ADP sont ensuite recyclés en actine-G/ATP puis sont à nouveau incorporés dans le filament en croissance. Ce processus ininterrompu de polymérisation / dépolymérisation de l'actine est appelé le phénomène de « tapis roulant » ou « treadmilling ». Le

moteur principal assurant la continuité de ce cycle est l'hydrolyse irréversible de l'ATP en ADP, permettant une incorporation continue de l'actine-G/ATP remplaçant l'actine-G/ADP se détachant du polymère d'actine-F (Campellone and Welch, 2010; Disanza† et al., 2005). Cette régulation est assurée en réponse à des stimuli extra ou intracellulaires, médiés, entre autres, par la famille des Rho-GTPases.

### **4.1.3 L'organisation générale de l'actine dans la cellule : les « fibres de tension »**

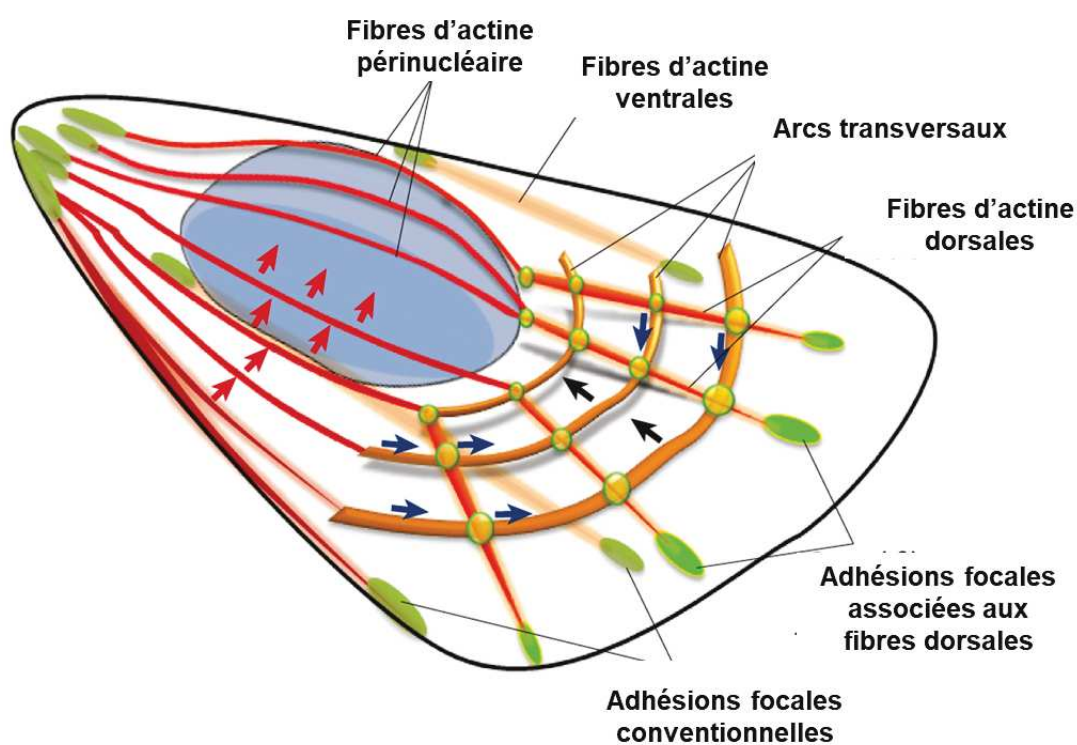
La contraction du cytosquelette est un processus résultant du glissement des fibres d'actine sur une protéine « motrice » appelée la myosine II. Ces deux structures sont maintenues grâce à des protéines de liaison, comme l' $\alpha$ -actinine, qui créent des ponts entre l'actine-F et la myosine et forment les structures contractiles de la cellule, appelées les fibres de tension ou « Stress fibers ». Les fibres de tension sont classées en plusieurs sous-groupes, selon leur organisation structurale, leurs connexions avec les adhésions focales (FAs), qui sont des complexes multi-protéiques situés à la membrane plasmique permettant l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire, et selon leurs fonctions cellulaires.

On retrouve ainsi les fibres dorsales, qui sont des fibres non contractiles, caractérisées par l'absence de myosine II et leur adhésion aux FAs par une seule extrémité. Les fibres dites « arcs transversaux » sont des structures courbées, caractérisées par une alternance périodique de myosine II et d' $\alpha$ -actinine, ils sont connectés indirectement aux FAs par l'intermédiaire des fibres dorsales. Les fibres ventrales sont des faisceaux contractiles d'actomyosine, ancrées aux FAs au niveau des deux extrémités de la cellule et positionnées au niveau de la base de la cellule. Les fibres d'actine périnucléaire ou « perinuclear actin cap » sont des « câbles d'actine » entourant le noyau des cellules, permettant de connecter l'enveloppe nucléaire directement aux FAs (Figure 17) (Maninová and Vomastek, 2016).

## **4.2 Les protéines associées à l'actine : ABPs**

La dynamique du « tapis roulant » de l'actine est un processus essentiel régulant des fonctions cellulaires fondamentales telles que la formation des lamellipodes et des filopodes au moment de la migration cellulaire ou le positionnement des organites intracellulaires. Cette





**Figure 17. Modèle hypothétique des différents types de fibres de tension.**

Les fibres de tension, excepté les arcs transversaux, sont ancrées à la matrice extracellulaire au niveau des adhésions focales. Les différentes flèches indiquent les mouvements de tension exercés par les différents types de fibres, permettant à la cellule d'adapter sa réponse biologique en fonction du stimulus. Adapté de Maninová & Vomastek, 2016.

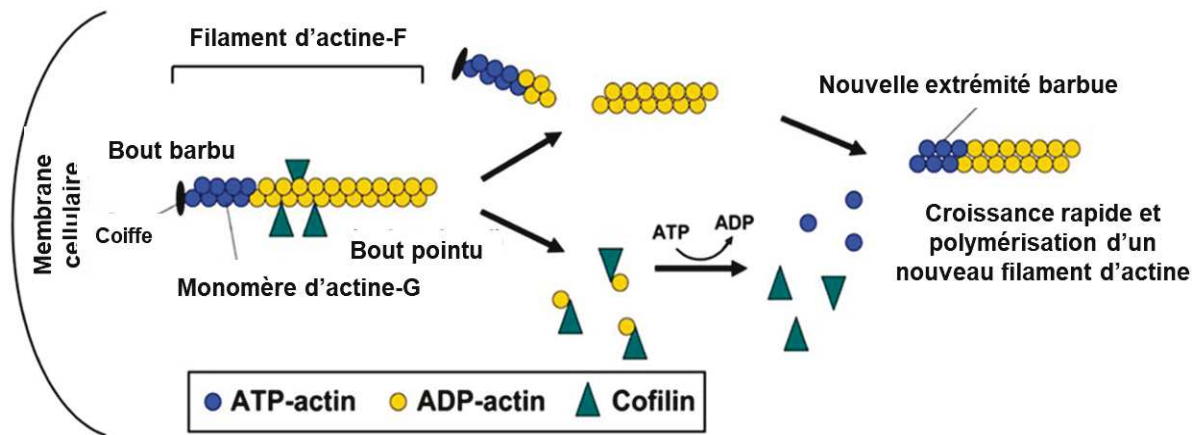
dynamique du cycle de l'actine-G/ actine-F est assurée par une multitude de protéines associées à l'actine : ABP (actin-binding-proteins). Ces protéines permettent le contrôle de la longueur des filaments d'actine, leur renouvellement et leur vitesse d'assemblage et de désassemblage. La régulation de ces différents événements par les protéines ABPs assure le maintien de l'homéostasie de l'actine dans les cellules.

#### **4.2.1 Les facteurs de dépolymérisation de l'actine : la famille ADF/cofiline**

Certaines familles de protéines associées à l'actine interviennent dans la régulation de la dynamique de l'actine par la liaison aux monomères d'actine-G. Cette régulation est assurée soit par la séquestration des monomères d'actine-G dans le cytosol (fonction assurée par la famille des formines) ou bien par le contrôle de l'incorporation ou de la dissociation de l'actine-G au niveau des extrémités plus et moins du filament d'actine, respectivement. Ce dernier rôle est assuré notamment par la famille des ADF (Actin Depolymerizing Factor) /cofilines.

La famille ADF/cofiline comporte des petites protéines d'un poids moléculaire de 18kDa qui sont hautement conservées au cours de l'évolution. Chez les mammifères, la famille ADF/cofiline est composée de trois protéines homologues: le facteur de dissociation de l'actine (ADF), cofiline-1 (CFL1) d'expression ubiquitaire et cofiline-2 (CFL2) dont l'expression est spécifique du muscle squelettique (Kanellos and Frame, 2016). Ces protéines régulent le renouvellement de l'actine. Cette régulation est permise grâce à leur capacité à lier les monomères d'actine-G.

La cofiline décore les filaments d'actine « âgés », à l'extrémité pointue, où elle se lie à des dimères d'actine-G/ADP. La liaison de la cofiline à cette extrémité engendre une torsion et un changement conformationnel du filament d'actine. Cette torsion se propage le long du filament d'actine entraînant sa fragilisation. Ceci engendre soit une dépolymérisation du filament d'actine par la dissociation de l'actine-G de l'extrémité pointue, ou bien entraîne une coupure du filament d'actine. En plus de permettre la dépolymérisation de l'actine, la cofiline participerait également de manière indirecte à la nucléation/polymérisation de l'actine-F. Ce deuxième rôle assuré par sa capacité à générer de nouvelles extrémités barbues, nécessaires pour l'incorporation de nouveaux monomères d'actine-G/ATP, mais aussi grâce à l'augmentation du pool d'actine-G/ADP qui est ensuite recyclée et réincorporée au niveau de l'extrémité barbue du filament d'actine. Ainsi, les



**Figure 18. L'activité de la cofiline.**

Lorsqu'elle est active, la cofiline coupe les filaments d'actine en oligomères et monomères d'actine-ADP. Elle favorise, à la fois, la formation de nouvelles extrémités barbues pour la polymérisation de nouveaux filaments d'actine et le recyclage des monomères d'actine qui sont réincorporés dans le nouveau filament d'actine naissant. La cofiline assure donc le renouvellement de l'actine. Adapté de Pontrello & Ethell, 2009.

cofilines permettent d'assurer le renouvellement et la continuité du cycle de polymérisation/dépolymérisation de l'actine (Figure 18) (Kanellos and Frame, 2016; Mizuno, 2013).

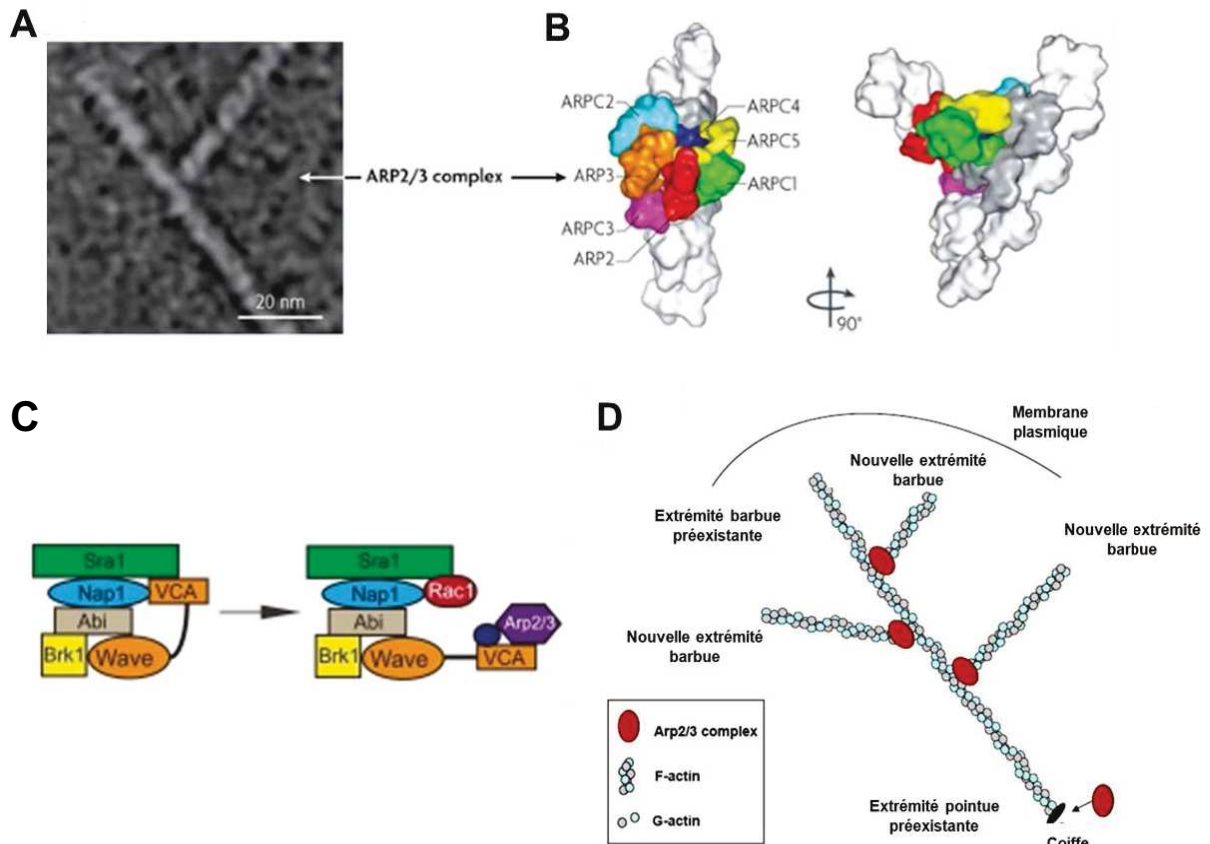
#### **4.2.2 Les facteurs de nucléation de l'actine : le complexe Arp2/3**

Afin d'initier la nucléation de nouveaux filaments d'actine, les cellules utilisent des facteurs de nucléation et d'élongation de l'actine requis pour assurer leurs fonctions biologiques diverses, notamment l'adhésion et la migration cellulaires (Lee and Dominguez, 2010).

Le complexe Arp2/3 est l'un des premiers facteurs de nucléation à avoir été identifiés, et l'un des mieux caractérisés. Il s'agit d'un gros complexe protéique de 220 kDa, composé de 7 polypeptides : deux protéines apparentées à l'actine, appelées Arp2 et Arp3 (Actin-related-proteins), d'où le nom de ce complexe, et cinq autres sous-unités appelées ArpC1, ArpC2, ArpC3, ArpC4 et ArpC5 (Figure 19). Ce complexe protéique est hautement conservé au cours de l'évolution. En effet, l'analyse comparative de plusieurs génomes eucaryotes a montré la présence de gènes codant pour chacune des sous-unités du complexe Arp2/3. Par ailleurs, il a été également montré que chez la plupart des eucaryotes, certaines sous-unités de ce complexe sont codées par plus d'un seul gène. Chez les mammifères par exemple, Arp3, est présente sous deux isoformes dans les cellules (ACTR3A, ACTR3B), avec une identité de 91% entre les deux isoformes (Abella et al., 2016).

L'une des particularités du complexe Arp2/3 consiste en sa capacité à induire la nucléation de l'actine et de l'organiser en réseaux ramifiés. Afin d'induire la formation de nouveaux filaments d'actine, le complexe Arp2/3 se lie à un filament d'actine préexistant et initie la polymérisation d'un filament fille, appelé également branche fille. Le complexe Arp2/3 se localise à la base de cette branche, formant un angle en Y, à 70° par rapport à la branche mère. Ainsi, l'extrémité pointue du filament fille est engagée par le complexe Arp2/3 au niveau de l'angle de la branche, alors que l'extrémité barbue permet l'élongation du filament fille par l'incorporation de nouveaux monomères d'actine-G (Figure 19) (Campellone and Welch, 2010).

Le complexe Arp2/3 possède une faible activité intrinsèque de nucléation (Mullins et al. 1998.), et tout seul, il est incapable d'amorcer la formation de nouveaux oligomères d'actine. Afin d'être activé, le complexe Arp2/3 nécessite à la fois la présence d'un filament d'actine préexistant



**Figure 19. Structure du complexe Arp2/3 et son rôle dans la nucléation de nouveaux filaments d'actine.**

(A) La morphologie de la branche Y du filament d'actine et du complexe Arp2/3 en micrographie électronique et (B) modèles structuraux du complexe Arp2/3 en tomographie électronique. Adapté de Campellone & Welch, 2010. (C) Le complexe Scar/WAVE à l'état inactif (à gauche) et actif (à droite), suite à la liaison de RAC1. Lorsque le complexe Scar/WAVE est actif, il recrute le complexe Arp2/3. Adapté de S. M. Abmayr & Pavlath, 2012. (D) Représentation schématique du processus de nucléation de nouvelles branches d'actine à partir du filament d'actine mère par le complexe Arp2/3. La nucléation a lieu au niveau des nœuds en Y, à 70° de la branche mère et permet la formation de nouvelles extrémités barbues. Adapté de Pontrello & Ethell, 2009).

(filament mère) et des facteurs de nucléation de la famille NPFs (Nucleation Promoting Factors). Les protéines de la famille NPFs sont toutes caractérisées par la présence d'un motif conservé au niveau de leur extrémité C-terminale, appelé le motif WCA, indispensable pour l'activation du complexe Arp2/3. Il s'agit d'une région subdivisée en trois segments : le motif W, appelé également WH2 (Wiscott-Aldrich syndrome protein-Homology-2), le motif C (une région amphipathique connective) et le motif A (peptide acide) (Campellone and Welch, 2010). Lorsque le complexe Arp2/3 est inactif, les sous-unités du complexe sont séparées. L'activation du complexe Arp2/3 est induite par la liaison de la portion CA du motif WCA aux sous-unités du complexe Arp2/3. Cette liaison entraîne des changements conformationnels du complexe Arp2/3 qui adopte une conformation semblable au filament d'actine, de telle sorte qu'Arp2 et Arp3 constituent les deux premières sous-unités de l'extrémité pointue de la nouvelle branche d'actine (Figure 19) (Lee and Dominguez, 2010; Robinson R.C. et al., 2001). Le domaine WH2 permet alors la liaison de nouveaux monomères d'actine-G. Ainsi, le monomère d'actine-G lié par le motif WH2 avec Arp2 et Arp3 forment le noyau trimérique permettant la nucléation d'un nouveau filament d'actine au niveau de la branche Y. Suite à l'activation du complexe Arp2/3, le motif WCA se dissocie et amorce d'autres sites de nucléation à d'autres endroits de filaments d'actine mère, permettant la formation de plusieurs ramifications à partir d'une même branche principale (Figure 19, 20) (Campellone and Welch, 2010).

### **4.3 Les rôles de RAC1 dans la régulation de la dynamique de l'actine**

La famille des Rho-GTPases, notamment RAC1, jouent le rôle de médiateurs cellulaires permettant de véhiculer des signaux chimiques ou mécaniques externes dans toute la cellule. Les GTPases agissent sur des protéines effectrices, notamment les protéines régulatrices du cytosquelette. Ces protéines une fois activées permettent à leur tour d'orchestrer le remodelage de l'actine qui est sous-jacent aux différents événements tels que la formation des lamellipodes (Ridley et al., 1992), les filopodes, l'adhésion et la migration cellulaires.

#### **4.3.1 Régulation des cofilines par phosphorylation/déphosphorylation**

À ce jour, plusieurs travaux ont mis en évidence plusieurs mécanismes de régulation de la famille des ADF/cofilines, allant d'une régulation par le pH intracellulaire, des interactions avec des phosphoinositides membranaires ou des protéines de liaison à l'actine ABPs à une régulation par la GTPase RAC1 (Ono, 2007).

La GTPase RAC1 intervient dans la régulation de l'état d'activation des cofilines par plusieurs mécanismes. Les cofilines assurent le renouvellement de l'actine dans les cellules grâce à leur capacité à osciller entre un état inactif lorsqu'elles sont phosphorylées et un état actif lorsqu'elles sont déphosphorylées (Mizuno, 2013). L'inhibition des cofilines est assurée par une cascade de phosphorylations en aval de la GTPase RAC1. Lorsque RAC1 est activée, elle entraîne une phosphorylation des protéines de la famille des kinases P-21 (PAKs). Ces kinases PAKs entraînent à leur tour la phosphorylation des kinases à domaine LIM (LIMK1 et LIMK2) au niveau de la thréonine 508 (Thr508). Une fois activées, les kinases LIMK1 et LIMK2 phosphorylent les cofilines sur le résidu sérine-3 (Ser-3), au niveau du domaine de liaison à l'actine. Cette phosphorylation entraîne une perte de la liaison de l'actine G et de l'actine F et inhibe l'activité de scission du filament d'actine (Moriyama et al., 1996). D'autre part, il a été montré que la GTPase RAC1 joue également un rôle dans l'activation de la cofiline. La levée de l'inhibition de cofiline est assurée, entre autres, par la phosphatase de la famille Slingshot (SSH1). Liu *et al.* (2015) ont montré que l'inhibition de l'expression de RAC1 dans les kératinocytes entraîne à la fois une diminution de l'expression et de la phosphorylation de SSH1 ainsi qu'une augmentation significative de la phosphorylation de cofiline. Par ailleurs, la dépolymérisation de l'actine (due à l'absence de RAC1 ou induite par l'inhibiteur de l'actine latrunculine-A) a également eu pour effet une diminution de l'expression de SSH1. De plus, d'autres études ont montré que SSH1 interagit étroitement avec les filaments d'actine et que l'activité phosphatase de SSH1 est significativement augmentée suite à son interaction avec l'actine-F, entraînant l'activation de la cofiline et l'augmentation de son activité de scission des filaments d'actine (Kurita et al., 2008). Cette balance entre l'état phosphorylé/déphosphorylé des cofilines, assuré par les rôles opposés de RAC1, est à l'origine du maintien du renouvellement de l'actine, tel qu'il a été décrit dans la section IV.2.1 (Figure 20).

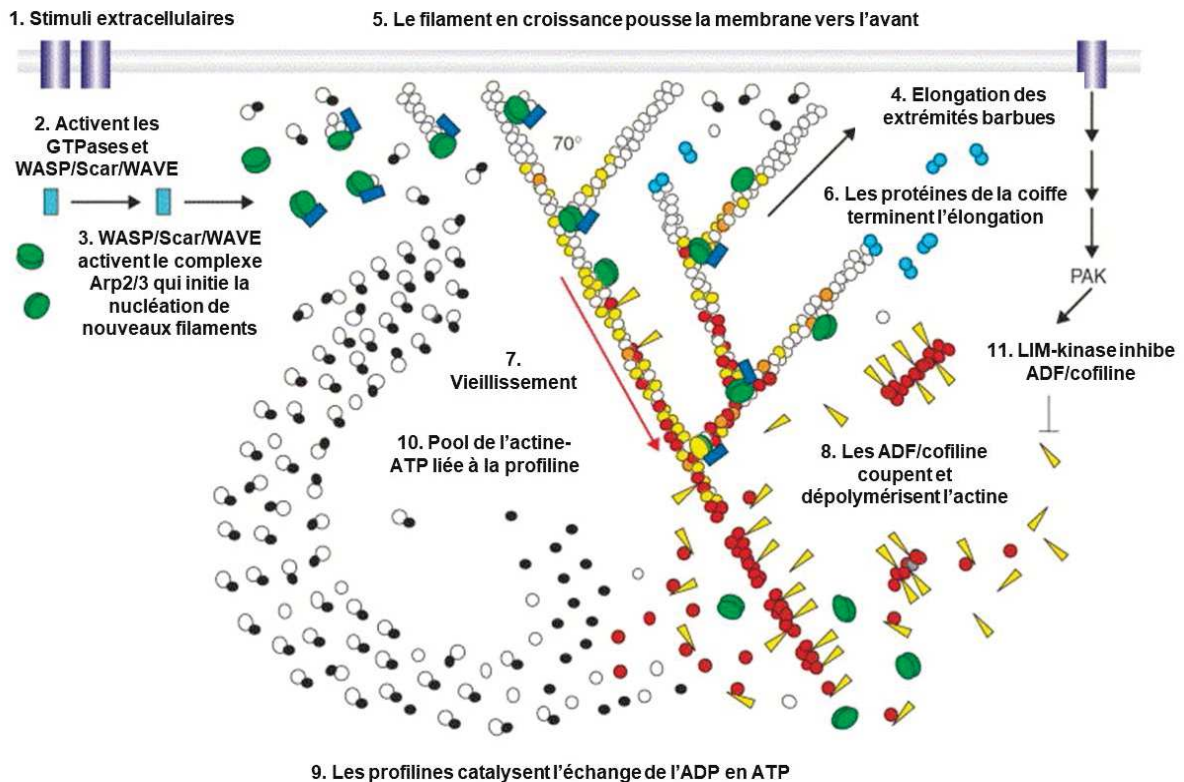
#### **4.3.2 Régulation du complexe Arp2/3 par le complexe WAVE**

Outre son rôle dans la régulation du renouvellement de l'actine à travers la famille ADF/cofiline, RAC1 joue également un rôle dans la polymérisation de l'actine à travers l'activation du complexe Arp2/3. Comme je l'ai décrit dans la section IV.2.2, l'activation du complexe Arp2/3 nécessite la présence de facteurs de nucléation (NPFs) qui sont eux-mêmes régulés par la GTPase RAC1. C'est le cas notamment des NPFs de la famille WASP (Wiscott-Aldrich-Syndrome Proteins).

La famille WASP comprend plusieurs familles de protéines, dont WASP, N-WASP (Neuronal-WASP) et WAVE (WASP family Verprolin Homologous Protein), exprimée sous trois isoformes WAVE1, WAVE2 et WAVE3. La caractéristique commune aux protéines de la famille WASP consiste en la présence d'une région riche en proline et d'un domaine WCA à leur extrémité C-terminale. Le domaine WCA est requis notamment pour le recrutement et l'activation du complexe Arp2/3 permettant d'initier la nucléation et la polymérisation de nouvelles branches d'actine, à partir d'un filament d'actine mère (Figure 19, 20). En revanche, leur extrémité N-terminale présente des différences structurales majeures, impliquant des différences dans le mode de régulation et d'activation par les Rho-GTPases. En effet, les protéines WASP et N-WASP comportent un domaine de liaison des Rho-GTPase appelé le domaine GBD. Ce domaine permet la liaison de la GTPase Cdc42 permettant ainsi de les activer. En revanche, les protéines WAVE sont dépourvues de ce domaine GBD, indiquant une absence de liaison directe de la GTPase RAC1 et impliquant un mode de régulation différent de WASP et N-WASP.

Les protéines WAVE sont présentes dans les cellules sous trois isoformes : WAVE1 et 3, exprimées essentiellement dans le cerveau, et WAVE2 dont l'expression est ubiquitaire. Contrairement aux protéines WASP et N-WASP, l'interaction entre RAC1 et WAVE se fait de manière indirecte, du fait de l'absence du domaine de liaison des GTPases. La protéine IRSp53 (Insulin Receptor Substrate protein 53) fut la première protéine à avoir été identifiée pour avoir un rôle dans l'interaction entre WAVE2 et RAC1. Cette protéine possède un domaine de liaison SH3 (Src homology 3) pouvant se lier à la région riche en proline (PRD) de WAVE2. Par ailleurs, il a été montré que la protéine IRSp53 peut également lier RAC1 à travers son domaine de liaison de RAC (RCB). Ainsi, cette protéine établit un complexe trimérique et joue le rôle de pont entre WAVE2 et RAC1. De plus, il a été montré qu'IRSp53 est capable de stimuler l'activité du complexe Arp2/3 dépendante de WAVE2.





**Figure 20. Le processus de polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine.**

La polymérisation de l'actine est initiée par un ou plusieurs signaux extracellulaires entraînant l'activation des Rho-GTPases. Suite à leur activation, ces Rho-GTPases (comme RAC1) activent les complexes de nucléation des protéines (WASP/Scar/WAVE) qui à leur tour stimulent l'assemblage du complexe Arp2/3 qui initie la nucléation de nouvelles branches d'actine à partir d'une branche mère. La terminaison de l'élongation est assurée par des protéines de la coiffe. La dépolymérisation des filaments « âgés » d'actine est assurée par les protéines de la famille ADF/cofiline qui permettent la formation de nouveaux monomères d'actine qui sont ensuite réincorporés dans un nouveau cycle de nucléation aux extrémités barbues. La force générée par la polymérisation de l'actine branchée entraîne le mouvement des cellules vers l'avant par le moyen des lamellipodes. Adapté de Holz & Vavylonis, 2018 et Pollard et Beltzner, 2002.

D'autres études ont également mis en évidence l'implication d'autres protéines dans l'activation de WAVE2 par la GTPase RAC1. On sait à ce jour que WAVE existe sous forme d'un complexe hétéro-pentamérique dans les cellules eucaryotes, appelé le complexe WRC (WAVE Regulatory Complexe). Ce complexe est composé notamment de WAVE associée à quatre autres protéines : Sra1/PIR121b (Specifically RAC1-associated protein1), Nap1 (NCK-associated protein 1), Abi1/2 (ABL interactor 1/2), et BRK1 (ou HSPC300). Ces protéines semblent cruciales pour le maintien de la stabilité de ce complexe et pour permettre l'interaction entre RAC1 et WAVE2 (Figure 19) (Abmayr and Pavlath, 2012). L'interaction de RAC1 avec Sra1 permet d'initier l'activation de WAVE permettant d'activer le complexe Arp2/3 et la nucléation de l'actine (Figure 19).

## **5 Rôle de l'actine dans la mécanotransduction**

### **5.1 La mécanotransduction : définition**

Les cellules eucaryotes sont constamment exposées à des stimuli provenant de la matrice extracellulaire ou du microenvironnement cellulaire. Grâce à des structures spécialisées, appelées les « mécano-senseurs », présentes à la membrane plasmique, les cellules sont capables de percevoir ces signaux mécaniques et de les convertir en réponses biologiques adaptées. Ce processus, appelé la mécanotransduction, est fondamental pour assurer le bon fonctionnement des cellules et pour leur permettre de s'adapter aux changements mécaniques constants et très dynamiques de leur microenvironnement. Plusieurs mécano-senseurs sont présents à la membrane plasmique, certains formant de gros complexes multi-protéiques, permettant de transmettre des signaux divers vers la cellule et d'activer plusieurs voies de signalisation en aval. C'est le cas notamment des adhésions focales qui constituent les points d'ancrage et les principaux intermédiaires entre les cellules et la matrice extracellulaire (Martino et al., 2018).

### **5.2 Les adhésions focales (FAs)**

Les premières observations microscopiques des FAs ont été réalisées en 1971. Les FAs ont été identifiées dans des fibroblastes en culture, et ressemblaient à des structures denses aux électrons, appelées les « plaques d'attachement » (Abercrombie et al., 1971).

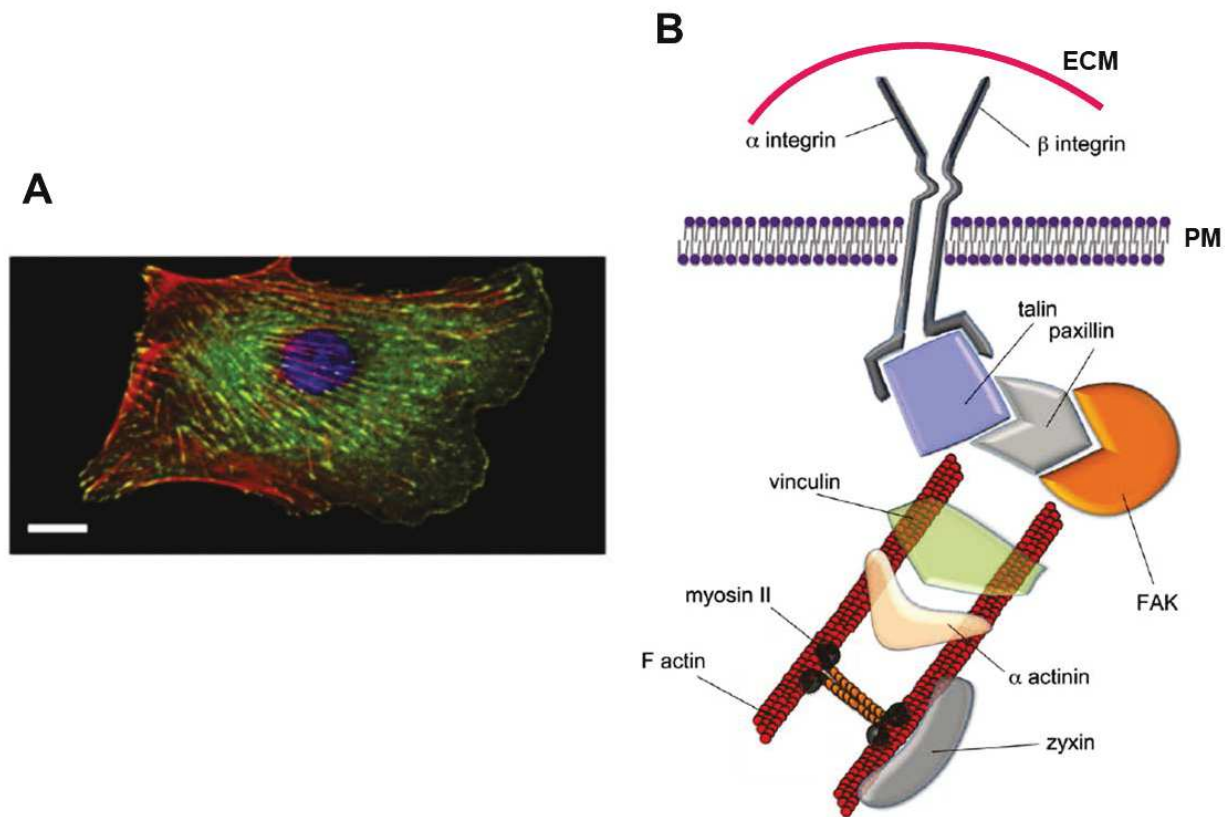
Les adhésions focales sont de gros complexes multi-protéiques présents à la surface de toutes les cellules. Ce sont des structures dites « mécanosensibles » puisqu'elles ont la capacité à percevoir et à transférer des signaux mécaniques provenant de la matrice extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. Elles permettent ainsi d'établir le contact entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine. Une fois activées, les FAs assurent la transmission de signaux mécaniques en réponses biochimiques, se traduisant par le remodelage du cytosquelette d'actine permettant à la cellule d'adapter ses réponses biologiques, telles que l'adhésion ou la migration cellulaires, le changement de la forme, l'apoptose et la prolifération (Kuo, 2014; Martino et al., 2018).

### **5.2.1 Structure des adhésions focales**

Les FAs sont de gros complexes multi-protéiques, dont la structure est caractérisée par la présence de trois domaines : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. Les FAs sont composées de plusieurs protéines assurant des rôles différents et essentiels à leur fonction. Les intégrines, ou les protéines dites « mécano-sensibles » forment le noyau central des FAs et assurent le rôle de protéines de signalisation par leur capacité à percevoir et à transmettre les signaux extracellulaires vers l'intérieur de la cellule. Les autres protéines des FAs sont soit des kinases, notamment la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase) permettant la phosphorylation des autres sous-unités du complexe, des protéines de structure comme la taline et la vinculine, assurant la stabilisation des FAs, des protéines de régulation du cytosquelette d'actine comme la paxilline, la zyxine ou l' $\alpha$ -actinine et les GTPases, notamment Rho et RAC1 permettant la régulation de l'actine, indispensable au bon fonctionnement des FAs (Figure 21) (Haase et al., 2014).

#### **5.2.1.1 Les intégrines**

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires présents sous forme d'hétérodimères de sous-unités d'intégrines  $\alpha$  et  $\beta$ . Chez les mammifères, la famille des intégrines comporte 18



**Figure 21. Structure des adhésions focales.**

(A) Image de microscopie en immunofluorescence d'un myoblaste de souris (C2C12) cultivé sur un substrat en verre recouvert de 0,1% de gélatine. La cellule est marquée avec les anticorps anti-vinculine (marqueur des adhésions focales, en vert) et anti-actine (en rouge). Echelle: 10  $\mu\text{m}$ . Adapté de Haase, Al-Rekabi, & Pelling, 2014. (B) Représentation schématique des principaux constituants protéiques des adhésions focales. Les adhésions focales matures sont de gros complexes macromoléculaires composés de plusieurs protéines assurant le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. Les intégrines perçoivent les signaux mécaniques provenant de l'environnement extracellulaire qui sont ensuite transmis vers le cytosquelette d'actine via les protéines assurant le pont entre l'actine et les intégrines, telles que la vinculine, taline, paxilline et zyxine. Adapté de Van Tam et al., 2012.

sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$ , pouvant s'associer par des liaisons non covalentes pour former 24 hétérodimères d'intégrines identifiés à ce jour. Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des intégrines sont composées d'un domaine (tête) extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine (queue) cytoplasmique (Figure 21). Les intégrines sont caractérisées par leur capacité à lier plusieurs ligands de la matrice extracellulaire, notamment la fibronectine, le collagène, la vitronectine et les laminines (Kechagia et al., 2019; Kuo, 2014; Martino et al., 2018).

Les intégrines sont des molécules de signalisation bidirectionnelle, permettant de connecter les cellules à leur environnement extracellulaire. Elles régulent l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire, soit par des signaux provenant de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule par le processus « Inside-Out », ou bien en véhiculant des informations provenant de la matrice extracellulaire vers le cytoplasme par le processus « Outside-In ». La liaison des têtes des intégrines à leurs ligands entraîne leur activation et leur dimérisation au niveau de la membrane plasmique. Cette activation se traduit par un changement de conformation majeur permettant à la queue cytoplasmique des intégrines de s'étendre, permettant le recrutement des autres sous-unités du complexe des adhésions focales qui lient les intégrines à l'actine. Cette liaison indirecte des intégrines à l'actine entraîne des remodelages conformationnels de l'actine, permettant l'activation de plusieurs voies de signalisation et activant plusieurs réponses biologiques, notamment la migration cellulaire (Kechagia et al., 2019; Kuo, 2014; Martino et al., 2018).

Chaque cellule de l'organisme possède un type spécifique d'intégrines à la membrane plasmique, qui constitue sa signature. Le muscle squelettique, notamment les myotubes matures et les fibres musculaires squelettiques, expriment majoritairement l'intégrine  $\alpha7\beta1$ , qui est un récepteur à la laminine, exprimé de façon ubiquitaire et localisé au niveau des costamères avec le complexe dystroglycane. En plus de permettre la liaison entre la matrice extracellulaire et l'actine des cellules musculaires, l'intégrine participe également au maintien de la stabilité du muscle au cours de la contraction musculaire (Boppart and Mahmassani, 2019; Mayer, 2003). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la délétion du gène codant pour l'intégrine  $\beta1$  dans le muscle squelettique est létale chez la souris. Ces souris présentent des défauts dans la maturité musculaire avec notamment une accumulation des myoblastes immatures, soulignant le rôle important des intégrines dans la fusion des myoblastes en myotubes (Schwander et al., 2003).

### 5.2.1.2 La paxilline

Paxilline est l'une des premières protéines adaptatrices des complexes FAs à avoir été identifiée. Il s'agit d'une protéine d'ubiquitaire, d'une taille de 70 kDa comportant plusieurs domaines protéiques. Au niveau de son extrémité N-terminale, la paxilline comporte 5 domaines LD (LD1-LD5), domaines riches en leucine et en acide aspartique. Ces domaines sont des sites de liaison de paxilline à d'autres protéines, essentiellement à FAK et à la vinculine. Au niveau de l'extrémité N-terminale, la paxilline comporte également une région riche en proline permettant le recrutement de protéines à domaines SH3, notamment Src. On y trouve également plusieurs sites de phosphorylation (sérine/thréonine/tyrosine) agissant comme substrats de plusieurs kinases et phosphatases, notamment les résidus Tyr<sup>31</sup> et Tyr<sup>118</sup> qui sont les substrats de la kinase FAK. Au niveau de l'extrémité C-terminale, la paxilline comporte une répétition en tandem de 4 domaines LIM (Lin-11, Isl-1 and Mec-3), qui sont des structures en double doigts de zinc, permettant la régulation de l'interaction de paxilline avec d'autres protéines. Ces domaines LIM, notamment LIM2 et LIM3, sont également responsables de l'adressage de la paxilline vers les FAs. Ces différents domaines confèrent à paxilline la propriété de liaison aux autres protéines formant les complexes FAs. La vinculine est la première protéine partenaire de paxilline à avoir été identifiée. Elle permettrait la liaison de la paxilline au cytosquelette d'actine. Par ailleurs, la phosphorylation de la paxilline par FAK permettrait la régulation de sa fonction de signalisation intracellulaire par la formation d'autres sites de liaison à d'autres protéines (Deakin and Turner, 2008; Schaller, 2001; Yang et al., 2017).

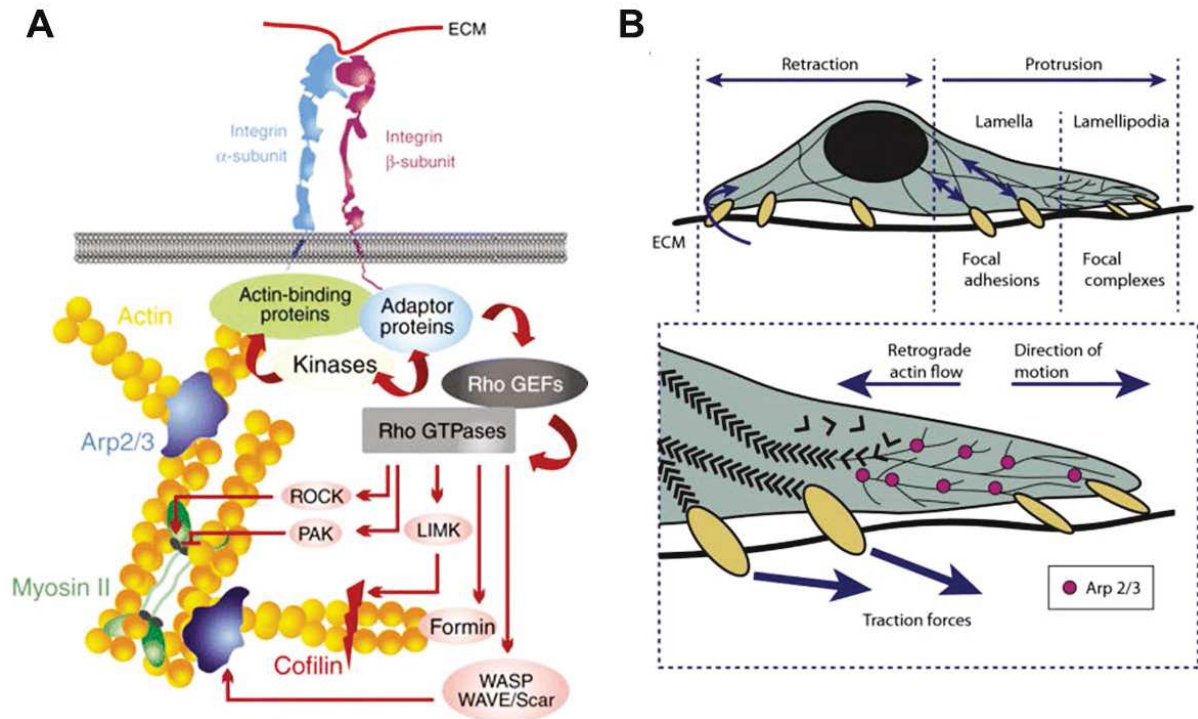
Sa liaison aux autres protéines structurales, telles que la vinculine, l'actine ou l'actopaxine permet à la paxilline de participer à plusieurs processus clés dans les cellules, tels que la migration, l'adhésion et le remodelage morphologique des cellules. Il a été observé que la délétion du gène codant pour la paxilline chez la souris entraîne des défauts de développement, notamment les structures originaires du mésoderme. Par ailleurs, les fibroblastes de ces souris ont montré des défauts de structure avec une réduction importante des lamellipodes entraînant un changement de la forme des cellules, qui deviennent plus rondes, en culture. Ces fibroblastes présentent des défauts de migration et d'adhésion ainsi que des défauts dans la structure du cytosquelette. Tous ces défauts indiquent que la paxilline est requise pour la motilité cellulaire (Hagel et al., 2002).

Dans le muscle squelettique, les costamères sont des structures protéiques sous-sarcolemmales assurant les fonctions de mécanotransduction, c'est-à-dire la transmission des signaux mécaniques provenant de la lame basale vers les cellules musculaires. La paxilline a été observée par microscopie à fluorescence au niveau des costamères en développement, dans les myoblastes et les myotubes murins (Quach and Rando, 2006). Ce n'est qu'en 2014 que la paxilline a été identifiée dans le muscle squelettique humain. Grâce à la microscopie confocale et à fluorescence, la paxilline a été identifiée au niveau des costamères du muscle squelettique où elle co-localise avec les protéines FAK et la dystrophine, suggérant une coopération de ces trois protéines dans la régulation de la mécanotransduction dans le muscle squelettique (Wilson et al., 2014).

## **5.2.2 Rôle du cytosquelette et des FAs dans la migration cellulaire**

La migration cellulaire est un processus biologique fondamental dans la vie de tous les organismes procaryotes et eucaryotes. Ce processus est très dynamique et implique une organisation hautement sophistiquée. Chez les mammifères, la migration cellulaire se produit en trois étapes clés : la formation de protrusions membranaires à l'avant de la cellule, la translocation du corps cellulaire et la rétraction de l'arrière de la cellule permettant de la propulser vers l'avant. La régulation de chacune de ces étapes est assurée, entre autres, par deux acteurs majeurs dont les fonctions sont interdépendantes : le cytosquelette d'actine et les adhésions focales (Kuo, 2014; Webb et al., 2002).

La première étape de la migration cellulaire commence par la polarisation de la cellule et la formation d'extensions membranaires appelées les lamellipodes et les filopodes. À la base de ces lamellipodes se forment des adhésions focales immatures, dites « naissantes » suite à l'activation des intégrines au contact de la matrice extracellulaire. Une fois activées, les intégrines recrutent les protéines de la voie RAC1, notamment les activateurs, les effecteurs et les cibles moléculaires de RAC1, qui sont les composants majeurs des FAs naissantes. RAC1 permet en effet d'activer la polymérisation de l'actine, soit en inactivant les facteurs de dissociation de l'actine comme cofiline ou en activant la nucléation de nouveaux filaments d'actine branchés par le complexe Arp2/3 (voir section IV.2.1 et IV.2.2). La formation des branchements d'actine est un



**Figure 22. Rôle de l'actine et des adhésions focales dans la migration cellulaire.**

(A) Représentation schématique du lien entre les Rho-GTPases et les adhésions focales. Les intégrines perçoivent les signaux mécaniques émanant de la matrice extracellulaire. Ces signaux activent la voie des Rho-GTPases (les GEFs qui à leur tour activent les Rho-GTPases). Lorsqu'elles sont activées, les Rho-GTPases, par plusieurs mécanismes notamment par la régulation des cofilines ou le facteur de nucléation Arp2/3, induisent la polymérisation des filaments d'actine, au niveau des adhésions focales. Adapté de (Vicente-Manzanares, Choi, & Horwitz, 2009). (B) Représentation schématique des mécanismes clés de la migration cellulaire. A l'avant de la cellule se trouvent les protrusions membranaires où a lieu la polymérisation de l'actine. La contraction des filaments d'actine permet de pousser la cellule vers l'avant. Adapté de Haase, Al-Rekabi, & Pelling, 2014.



processus fondamental pour la formation et le maintien des protrusions membranaires et des lamellipodes au moment de la migration cellulaire (Figure 22) (Kuo, 2014; Martino et al., 2018).

La deuxième étape du cycle de migration est initiée par la formation de liaisons moléculaires entre les faisceaux d'actine-F et les FAs naissantes permettant la maturation des FAs. La maturation des FAs est régulée par les protéines adaptatrices et de structure qui sont recrutées aux FAs, comme la paxilline, la vinculine et la taline, qui permettent de renforcer les liaisons moléculaires entre l'intégrine et l'actine-F au niveau de l'interface entre les lamellipodes et la « lamella ». Par ailleurs, cette deuxième étape de la migration cellulaire est caractérisée par la translocation du corps cellulaire. Le glissement des filaments d'actine sur la myosine II permet de générer une force contractile se propageant le long des filaments d'actine dans toute la cellule. Cette tension cellulaire permet alors la translocation du corps cellulaire vers l'avant (Figure 22) (Kuo, 2014).

La dernière étape de la migration cellulaire est caractérisée par le désassemblage des FAs matures à l'arrière de la cellule. La liaison des FAs aux facteurs de désassemblage, notamment des protéases comme la calpaine ou les protéines de la voie de l'endocytose, entraîne la rupture de la liaison entre l'intégrine et les protéines du complexe qui sont recyclées (Du et al., 1995; Franco and Huttenlocher, 2005; Kuo, 2014). Le désassemblage des FAs entraîne la rétraction de l'arrière des cellules permettant leur migration.

### **5.3 La mécanotransduction médiée par YAP/TAZ**

La mécanotransduction est le mécanisme permettant aux cellules de percevoir les signaux mécaniques et biochimiques provenant de leur environnement cellulaire et de les convertir en réponses biochimiques, notamment par l'activation de certains programmes génétiques permettant aux cellules d'adapter leurs réponses biologiques en fonction des stimuli extracellulaires. La mécanotransduction est notamment médiée par les protéines YAP (Yes-associated protein) (Sudol, 1995) et TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) appelée également WW Domain-containing Transcription Regulator 1 (WWTR1) (Dupont et al., 2011; Kanai et al., 2000). YAP et TAZ sont des coactivateurs transcriptionnels qui se relocalisent entre le noyau et le cytoplasme en réponse à des stimuli mécaniques provenant de l'environnement extracellulaire

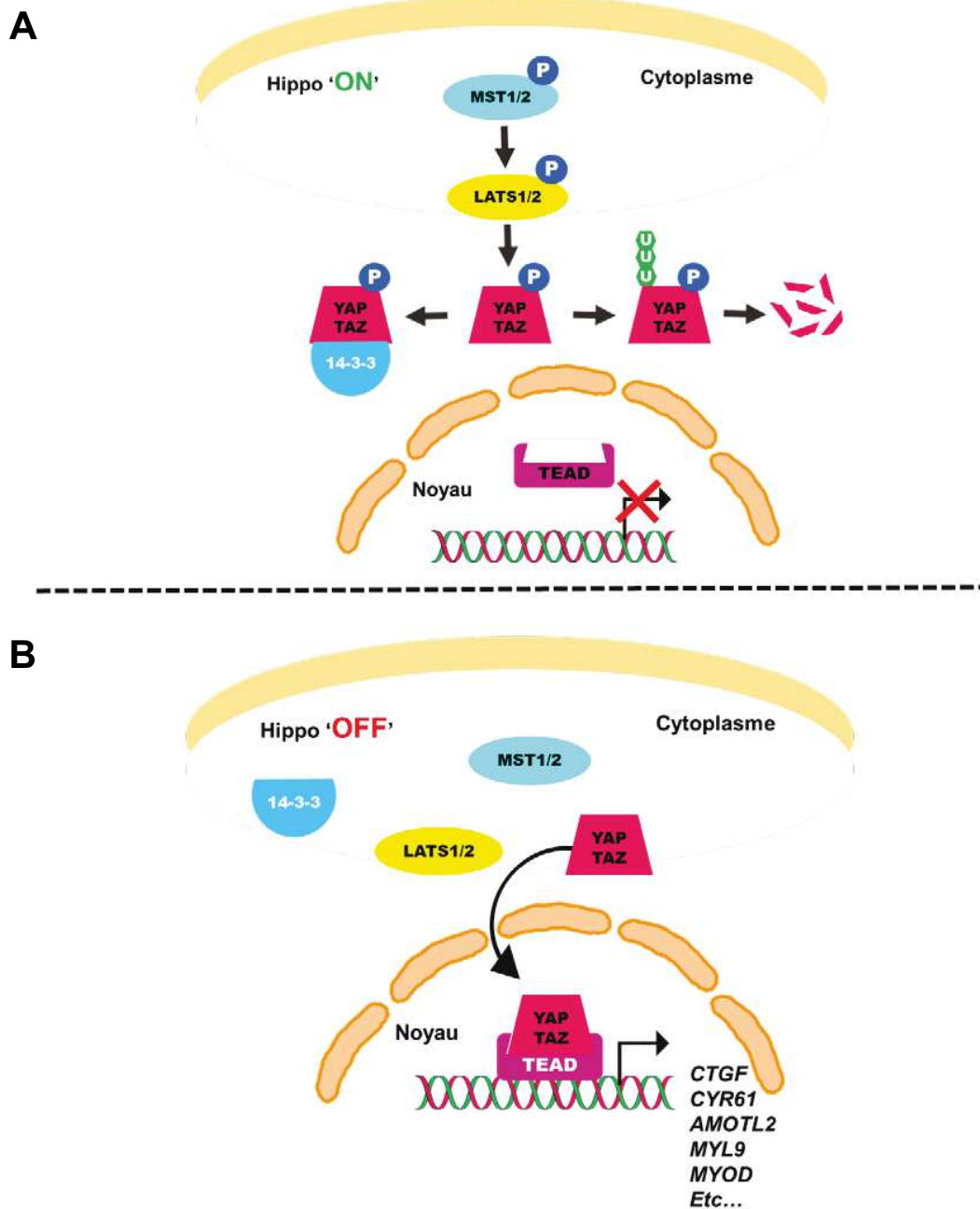
(Aragona et al., 2013; Halder et al., 2012). Ces deux coactivateurs transcriptionnels ont été identifiés comme les cibles moléculaires de la voie Hippo.

### **5.3.1 La voie Hippo**

La voie Hippo est impliquée dans plusieurs processus biologiques, notamment la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire, en réponse à des stimuli mécaniques. La voie Hippo consiste en une cascade de kinases qui phosphorylent et inhibent les coactivateurs transcriptionnels YAP et TAZ, qui sont les effecteurs majeurs de cette voie. L'activation de la voie Hippo entraîne l'activation de la kinase MST1/2 (Mammalian Ste20-like Kinase 1/2) qui phosphoryle à son tour et active le suppresseur de tumeur LATS1/2 (Large Tumor Suppressor 1/2). L'activation de la kinase LATS1/2 entraîne la phosphorylation de YAP au niveau des sérines S127 et S381 et TAZ en S89 et S311, entraînant la rétention cytoplasmique de YAP et TAZ médiée par la protéine 14-3-3 et/ou leur dégradation par le protéasome (Meng et al., 2016; Zhao et al., 2010). L'inactivation de la voie Hippo entraîne la levée de l'inhibition de YAP et TAZ qui se relocalisent dans le noyau où ils activent l'expression de leurs gènes cibles. YAP et TAZ n'ont pas de domaines de liaison à l'ADN et leur activité est médiée principalement par leur liaison aux facteurs de transcription de la famille TEAD (1-4) (Figure 23) (Meng et al., 2016; Zhao et al., 2010).

### **5.3.2 Rôle de l'actine dans la régulation de YAP/TAZ**

La voie Hippo est la voie canonique de régulation de YAP/TAZ mais d'autres mécanismes de régulations en réponse à des signaux mécaniques et indépendants de la présence de LATS1/2 existent. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de l'actine dans la mécanotransduction médiée par YAP/TAZ. En général, l'augmentation des niveaux de l'actine-F entraîne la localisation nucléaire de YAP et TAZ alors que la perte de l'actine-F entraîne leur rétention cytoplasmique. Il a été montré qu'en conditions de faible densité cellulaire, l'accumulation de l'actine-F inhibe la voie Hippo entraînant une diminution de la phosphorylation de YAP et sa translocation vers le noyau (Wada et al., 2011). De plus, l'inhibition des facteurs de dépolymérisation de l'actine comme la cofiline, la gelsoline ou les protéines de la coiffe CapZ permet la translocation nucléaire de YAP indépendamment de LATS1/2 (Aragona et al., 2013). Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de la GTPase Rho et de l'actine-F entraîne l'inhibition de l'expression des gènes cibles de YAP/TAZ, alors que l'induction de la polymérisation de



**Figure 23. Modèle de régulation de YAP/TAZ par la voie Hippo.**

(A) En réponse à des stimuli provenant de l'environnement extracellulaire, la voie Hippo s'active induisant la phosphorylation de la kinase MST1/2, qui à son tour phosphoryle la kinase LATS1/2. La phosphorylation de LATS1/2 entraîne la phosphorylation inhibitrice des protéines YAP et TAZ qui sont alors retenues dans le cytoplasme par la molécule 14-3-3 ou dégradées par le protéasome. (B) En absence d'activation de la voie Hippo, YAP et TAZ se relocalisent dans le noyau, où ils se lient au facteur de transcription TEAD, et activent la transcription de leurs gènes cibles. Adapté de Gandhi T. K et al., 2019.

l'actine permet la réactivation de ces deux coactivateurs transcriptionnels (Dupont et al., 2011). La famille des angiomotines (notamment AMOT, AMOTL1, AMOTL2) joue également un rôle dans la régulation de YAP/TAZ médiée par l'actine-F. Il a été montré que les angiomotines inhibent la localisation nucléaire de YAP en stimulant l'auto-phosphorylation de LATS1/2 et en activant sa liaison à YAP (Mana-Capelli and McCollum, 2018). De plus, les angiomotines possèdent un domaine de liaison à l'actine-F, et en l'absence de ce domaine, les angiomotines sont capables de lier YAP et de le retenir dans le cytoplasme, suggérant une compétition entre l'actine-F et YAP pour la liaison aux angiomotines (Mana-Capelli et al., 2014). Ces données suggèrent que la présence d'un niveau élevé d'actine-F permet la liaison des angiomotines, et la translocation de YAP vers le noyau, alors que l'absence de l'actine-F favorise la liaison de YAP aux angiomotines et sa rétention cytoplasmique (Dasgupta and McCollum, 2019).

### **5.3.3 Rôles de YAP/TAZ dans le muscle squelettique**

Le muscle squelettique est un organe très dynamique capable de s'adapter aux divers stress mécaniques provenant de l'environnement. Cela suggère que les cellules musculaires ont la capacité à percevoir et à intégrer ces signaux mécaniques par le mécanisme de mécanotransduction. Il a été montré que les cellules musculaires, notamment les myoblastes et les myotubes, expriment les protéines majeures de la voie Hippo notamment les co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ (Watt et al., 2010) et les facteurs de transcription de la famille TEAD, qui sont les effecteurs de YAP/TAZ (Joshi et al., 2017). Ces deux co-activateurs transcriptionnels interviennent dans la régulation de la masse musculaire. Il a été montré que YAP régule positivement la taille des fibres musculaires via sa liaison au facteur de transcription TEAD4, alors que l'inhibition de son expression dans le muscle adulte de souris entraîne une perte drastique de la masse et de la taille des fibres musculaire (Watt et al., 2015). Les niveaux d'expression de YAP et TAZ ainsi que leurs fonctions changent en fonction des différents stades de différenciation des cellules musculaires. De plus, YAP se localise dans les noyaux des C2C12 au stade myoblaste, et suite à la différenciation des C2C12 en myotubes, YAP se relocalise dans le cytoplasme sous sa forme inactive (phosphorylé en S127) (Watt et al., 2010). De plus, bien qu'ayant des fonctions redondantes dans les myoblastes, YAP et TAZ assurent des rôles différents au cours de la différenciation des cellules musculaires. Les travaux de Sun *et al.* (2017) ont montré que malgré leur capacité commune à promouvoir la prolifération des myoblastes, TAZ permet

également d'induire la différenciation des myoblastes en myotubes, alors que YAP joue le rôle d'inhibiteur de la différenciation. Malgré le fait que YAP et TAZ régulent des gènes cibles et des partenaires protéiques communs, notamment les angiomotines et les facteurs de transcription de la famille TEAD, TAZ régule d'autres gènes indépendamment de YAP, comme les gènes *Pax7*, *Myf5* et *MyoD* et interagit avec des partenaires protéiques spécifiques impliqués dans la myogenèse et dans l'organisation du cytosquelette (Sun et al., 2017).

## 6 Contexte et objectifs de la thèse

La myopathie myotubulaire représente la forme la plus grave et la plus sévère des CNMs. La principale problématique de cette myopathie est l'absence de traitements et le manque de compréhension des mécanismes physiopathologiques associés. Comme je l'ai décrit dans la première partie de l'introduction, la principale caractéristique histologique des patients atteints de la XLCNM consiste en une taille très réduite des fibres musculaires, leur forme arrondie et la localisation centrale des noyaux avec un élargissement de la matrice extracellulaire séparant les différentes fibres. Toutes ces anomalies sont révélatrices de défauts de l'organisation du cytosquelette et/ou des adhésions focales. Bien que quelques études aient mis en évidence quelques défauts moléculaires et cellulaires dans les modèles de XLCNM, peu d'entre elles ont été consacrées à la compréhension des voies moléculaires et cellulaires altérées dans la XLCNM qui expliqueraient les phénotypes cellulaires et histologiques associés.

De ce fait, les objectifs de ma thèse étaient d'identifier la/les voie (es) moléculaire (s) et cellulaire (s) altérée (s) dans la XLCNM à l'origine des défauts histologiques et moteurs liés à la maladie. Je me suis essentiellement focalisée sur l'étude de l'impact de la dérégulation du cytosquelette et des adhésions focales dans la XLCNM.

Afin de répondre à ces questions biologiques, j'ai analysé des données de transcriptomique et d'interactomique qui suggéraient l'implication de TIAM, une protéine régulatrice de la Rho-GTPase RAC1, dans les muscles de souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Suite à cette découverte, j'ai étudié toute la voie de régulation du cytosquelette par la GTPase RAC1, qui était dérégulée à la fois dans les muscles et dans les cellules musculaires des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Afin de montrer que les défauts de cette voie sont à l'origine des principales caractéristiques de la XLCNM, j'ai analysé et caractérisé des modèles de souris et des cellules dont l'expression de TIAM1 a été abolie ou dont l'activité de

RAC1 a été inhibée. Nos résultats ont montré que l'inhibition de TIAM1 reproduit certains défauts moteurs et des caractéristiques histologiques associés à la XLCNM. Nos données ont pu mettre en évidence, pour la première fois, un mécanisme moléculaire et cellulaire à l'origine des principales caractéristiques histologiques associées à la XLCNM.

# RÉSULTATS

## **Partie 1**

### **Publication 1: « Amphiphysin 2 modulation rescues myotubular myopathy and prevents focal adhesion defects in mice »**

#### **Contexte de l'étude**

La XLCNM, causée par les mutations du gène *MTM1* représente la forme la plus sévère des myopathies centronucléaires (Laporte et al., 1996). À ce jour, il n'existe aucune thérapie efficace pour traiter les patients atteints de cette myopathie, et les mécanismes physiopathologiques qui sont à l'origine de la maladie sont très peu élucidés. On sait à ce jour que MTM1 interagit, entre autres, avec une protéine impliquée dans le remodelage membranaire, BIN1, qui est elle aussi mutée dans d'autres formes de CNMs (Royer et al., 2013). Royer *et al* ont également montré que MTM1 stimule l'activité de tubulation des membranes médiée par BIN1. Par ailleurs, les mutations de BIN1 impliquées dans les CNMs entraînent la perte de la liaison entre MTM1 et BIN1 (Royer et al., 2013). Ces résultats suggèrent que l'interaction entre MTM1 et BIN1 soit cruciale pour la régulation du muscle squelettique. En revanche, les mécanismes physiopathologiques impliquant MTM1 et BIN1 dans les CNMs sont encore inconnus. Les mutations de MTM1 ou BIN1 entraînent une perte de fonction de ces deux protéines dans les CNMs. Cela suggère que la surexpression de BIN1 dans la myopathie myotubulaire puisse compenser la perte de l'expression de MTM1.

#### **Objectifs de l'étude**

Le principal objectif de cette étude était d'étudier la relation entre MTM1 et BIN1 dans le muscle squelettique dans des conditions physiologiques et dans la myopathie myotubulaire, avec la perspective de mettre au point une nouvelle approche thérapeutique pour traiter la myopathie myotubulaire dans les souris *Mtm1*<sup>-y</sup>. Par ailleurs, cette étude a permis d'élucider un mécanisme physiologique impliquant MTM1 et BIN1 dans le recyclage des adhésions focales.

#### **Résultats**



- ✓ Cette étude a permis de mettre au point une nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement des souris *Mtm1<sup>-y</sup>* basée sur la surexpression du transgène humain *BIN1* dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Cette approche est réalisée par le croisement génétique des souris femelles hétérozygotes pour le gène *Mtm1* avec des souris mâles portant le transgène humain de *BIN1* permettant de générer la lignée de souris *Mtm1<sup>-y</sup> Tg BIN1*.
- ✓ La surexpression de BIN1 dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup> Tg BIN1* a permis de prolonger la survie des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*, qui décèdent habituellement vers l'âge de 7 semaines, et de prévenir les phénotypes moteurs de ces souris. De plus, la surexpression de BIN1 a également empêché l'apparition des défauts histologiques typiques des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*, qui sont caractérisées par des fibres hypotrophiques, rondes avec des noyaux centraux.
- ✓ Une approche translationnelle a été développée afin de surexprimer BIN1 humain dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>* par l'utilisation des adénovirus associés (AAV). L'injection intramusculaire des AAV-BIN1 à l'âge de 3 semaines (âge de début des symptômes), ou bien son injection systémique à 1 jour après la naissance (pré-symptomatique) dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>* a permis de prévenir l'apparition des phénotypes caractéristiques de la XLCNM, de la même façon que dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup> Tg BIN1*, et de prolonger la survie de ces souris jusqu'à l'âge d'un an et demi. Cette approche a permis de montrer que la surexpression de BIN1 prévient la myopathie myotubulaire, même après la naissance.
- ✓ Le mécanisme moléculaire de cette approche thérapeutique a également été appréhendé. L'histologie des fibres musculaires de patients et des modèles animaux de la XLCNM est caractérisée, entre autres, par des fibres musculaires rondes, de petite taille avec un élargissement de l'espace entre les fibres. Ces anomalies des fibres sont révélatrices de défauts de l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Cette étude a mis en évidence une surexpression et des défauts de localisation de l'intégrine  $\beta 1$  dans les fibres musculaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>*, suggérant une implication de MTM1 dans le recyclage des adhésions focales. Afin de vérifier cette hypothèse, les myoblastes primaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* ont été phénotypés. Ces myoblastes ont montré des défauts d'adhésion, de migration et de fusion

en myotubes. Les défauts d'expression protéique et de localisation des adhésions focales ont été corrigés suite à la surexpression de BIN1 dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>*.

## **Conclusion**

Cette étude a permis d'identifier une nouvelle approche thérapeutique, basée sur la surexpression de BIN1, pour le traitement des XLCNM. De plus, le lien moléculaire entre MTM1 et BIN1 a été élucidé montrant que ces deux protéines coopéreraient dans le processus de recyclage des adhésions focales pour le maintien de l'intégrité des fibres musculaires.

## **Contribution**

Dans cette étude, j'ai contribué à l'établissement et au maintien des cultures primaires de myoblastes de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* qui ont servi dans l'étude du recyclage des adhésions focales. J'ai pris part à l'étude des défauts de recyclage des adhésions focales, notamment dans les expériences d'immuno-marquage de l'intégrine  $\beta 1$  dans les myoblastes primaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* (Figure 7, article 1). La majorité des résultats de l'article a été obtenue par Valentina Lionello, avec la contribution d'Anne-Sophie Nicot et plusieurs membres de l'équipe de Jocelyn Laporte. Ce travail était supervisé par Jocelyn Laporte et Belinda Cowling.

## MYOPATHIES

## Amphiphysin 2 modulation rescues myotubular myopathy and prevents focal adhesion defects in mice

Valentina M. Lionello<sup>1,2,3,4</sup>, Anne-Sophie Nicot<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, Maxime Sartori<sup>1,2,3,4</sup>, Christine Kretz<sup>1,2,3,4</sup>, Pascal Kessler<sup>1,2,3,4</sup>, Suzie Buono<sup>1,2,3,4\*</sup>, Sarah Djerroud<sup>1,2,3,4</sup>, Nadia Messadeg<sup>1,2,3,4</sup>, Pascale Koebel<sup>1,2,3,4</sup>, Ivana Prokic<sup>1,2,3,4</sup>, Yann Hérault<sup>1,2,3,4</sup>, Norma B. Romero<sup>7,8,9</sup>, Jocelyn Laporte<sup>1,2,3,4†‡</sup>, Belinda S. Cowling<sup>1,2,3,4\*‡</sup>

Copyright © 2019  
The Authors, some  
rights reserved;  
exclusive licensee  
American Association  
for the Advancement  
of Science. No claim  
to original U.S.  
Government Works

Centronuclear myopathies (CNMs) are severe diseases characterized by muscle weakness and myofiber atrophy. Currently, there are no approved treatments for these disorders. Mutations in the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin (MTM1) are responsible for X-linked CNM (XLCNM), also called myotubular myopathy, whereas mutations in the membrane remodeling Bin/amphiphysin/Rvs protein amphiphysin 2 [bridging integrator 1 (BIN1)] are responsible for an autosomal form of the disease. Here, we investigated the functional relationship between MTM1 and BIN1 in healthy skeletal muscle and in the physiopathology of CNM. Genetic overexpression of human BIN1 efficiently rescued the muscle weakness and life span in a mouse model of XLCNM. Exogenous human BIN1 expression with adeno-associated virus after birth also prevented the progression of the disease, suggesting that human BIN1 overexpression can compensate for the lack of MTM1 expression in this mouse model. Our results showed that MTM1 controls cell adhesion and integrin localization in mammalian muscle. Alterations in this pathway in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice were associated with defects in myofiber shape and size. BIN1 expression rescued integrin and laminin alterations and restored myofiber integrity, supporting the idea that MTM1 and BIN1 are functionally linked and necessary for focal adhesions in skeletal muscle. The results suggest that BIN1 modulation might be an effective strategy for treating XLCNM.

## INTRODUCTION

Centronuclear myopathies (CNMs) are severe congenital disorders characterized by muscle weakness, hypotonia, respiratory insufficiency, myofiber atrophy, and abnormal nuclei position (1). Currently, no specific therapy is available for patients, and the pathophysiology of these disorders is not well understood.

The most severe form of CNM is the X-linked form, also called myotubular myopathy (XLCNM; OMIM 310400). XLCNM is caused by mutations in the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin (*MTM1*) (2–5). Other forms of CNM are mainly due to mutations in bridging integrator 1 (*BIN1*), ryanodine receptor 1 (*RYR1*), and dynamin 2 (*DNM2*). Mutations in *BIN1* cause both autosomal recessive and dominant forms (OMIM 255200) (6, 7). *BIN1* encodes amphiphysin 2, a Bin/amphiphysin/Rvs domain protein that senses and induces membrane curvature and remodeling (8–11). Among the various tissue-specific isoforms of BIN1, the skeletal muscle isoform 8 contains a phosphoinositide binding domain important for the formation of transverse tubules (T-tubules), a highly specialized muscle structure crucial for excitation-contraction coupling (8, 12).

BIN1 is also important for clathrin-mediated endocytosis (13, 14) and is linked to nuclei positioning (15).

No similarity has been identified between MTM1 and BIN1 protein structures (16). MTM1 and BIN1 bind directly, and this interaction is important for membrane tubulation (16). Furthermore, BIN1 mutations leading to CNM disrupt this interaction (16), suggesting that the MTM1-BIN1 binding might be important for normal muscle function.

The muscle weakness of XLCNM correlates with a strong reduction in muscle fiber size, rounder fibers with increased interfiber space, abnormal centralization of nuclei or organelles such as mitochondria, and altered T-tubule structure (17). These hallmarks have been reproduced faithfully in the *Mtm1*<sup>-/-</sup> knockout mouse, which develops a progressive muscle weakness starting at 2 to 3 weeks of age, leading to death by 1 to 3 months of age (18, 19).

We hypothesize that the main defects of fiber shape and size are due to an alteration in focal adhesions. One of the key focal adhesion components and regulators are integrins (20, 21). Recently, MTM1 has been implicated in the exit of  $\beta_1$  integrin from endosomes (22), and depletion of *mtm*, the ortholog of *MTM1*, in drosophila muscle caused accumulation of integrin on endosomes (23). These results raise the possibility that MTM1, through integrins, is required for myofiber attachments. Integrins are part of the focal adhesion complex responsible for maintaining the connection between the cytoskeleton and the extracellular matrix (24). Integrins bind extracellular matrix proteins (such as fibronectin, laminin, and collagen), change their conformation, and recruit cytoskeletal regulators (such as vinculin) and kinases [such as focal adhesion kinase (FAK)] to activate downstream pathways (25). Integrins are actively recycled and can also signal from endosomes (26). Hence, they are key regulators of mechanotransduction, tissue integrity, cell shape, and migration (20). In muscle,  $\beta_1$  integrin is important for myoblast fusion, nuclei peripheral positioning, and sarcomere assembly (27–29) and is part

<sup>1</sup>IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), 67404 Illkirch, France. <sup>2</sup>INSERM U1258, 67404 Illkirch, France. <sup>3</sup>CNRS UMR7104, 67404 Illkirch, France. <sup>4</sup>Strasbourg University, 67404 Illkirch, France. <sup>5</sup>Grenoble Institute des Neurosciences, Université Grenoble Alpes, 38706 Grenoble, France. <sup>6</sup>INSERM U1216, 38706 Grenoble, France. <sup>7</sup>Université Sorbonne, UPMC Univ Paris 06, INSERM UMRS974, CNRS FRE3617, Center for Research in Myology, GH Pitié-Salpêtrière, 47 Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France. <sup>8</sup>Centre de référence de Pathologie Neuromusculaire Paris-Est, Institut de Myologie, GHU Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 75013 Paris, France. <sup>9</sup>Neuromuscular Morphology Unit, Institut de Myologie, GHU Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 75013 Paris, France.

\*Present address: Dynacure, 67400 Illkirch, France.

†Corresponding author. Email: jocelyn@igbmc.fr

‡These authors contributed equally to this work.

of the costamere that couples sarcomeric forces to the extracellular matrix (30).

The aim of this study was to investigate the relationship between MTM1 and BIN1 in skeletal muscle, under normal and pathological conditions. Because loss-of-function mutations in *MTM1* or *BIN1* cause CNM, we hypothesized that increasing BIN1 expression may compensate for loss of MTM1. This hypothesis was tested by increasing BIN1 either through a genetic cross with a humanized *BIN1* transgenic mouse or by exogenous expression of human *BIN1* in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice using adeno-associated virus (AAV) and by characterizing the CNM motor and histological phenotypes. We also investigated the focal adhesion pathway in the pathological model and upon BIN1-mediated rescue.

## RESULTS

### Increased expression of human BIN1 rescues *Mtm1*<sup>-/-</sup> survival

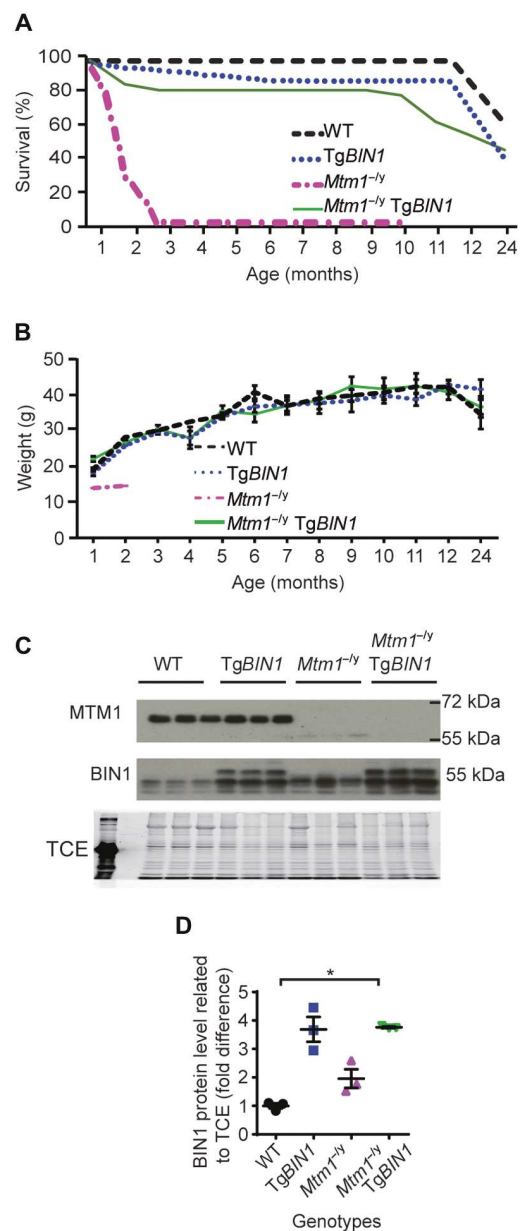
To study the epistasis between *MTM1* and *BIN1*, we modulated the expression of these genes in mice. We first investigated the effect of down-regulation of *Bin1* in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice. *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice start developing a progressive muscle disease closely resembling XLCNM from 3 to 4 weeks and die usually by 2 months of age (18). *Mtm1*<sup>+/-</sup> females were crossed with *Bin1*<sup>+/-</sup> males to obtain wild-type (WT), *Mtm1*<sup>-/-</sup>, *Bin1*<sup>+/-</sup>, and *Mtm1*<sup>-/-</sup> *Bin1*<sup>+/-</sup> mice. At embryonic day 18.5 (E18.5), 8.3% of embryos were *Mtm1*<sup>-/-</sup> *Bin1*<sup>+/-</sup>, whereas no *Mtm1*<sup>-/-</sup> *Bin1*<sup>+/-</sup> pups were obtained at 10 days after birth, showing that concomitant down-regulation of *Mtm1* and *Bin1* was not compatible with postnatal life (table S1).

Conversely, to up-regulate BIN1, we created transgenic mice expressing the human BIN1 gene (*TgBIN1*) by insertion of a human bacterial artificial chromosome (BAC) containing the human *BIN1* gene with its flanking sequence into the mouse genome (fig. S1A). Reverse transcription polymerase chain reaction, cloning, and sequencing from tibialis anterior (TA) muscles showed the presence of the human *BIN1* isoform 8 in five of six clones containing human BIN1 (fig. S1B). *BIN1* isoform 8 is the main muscle isoform (31). *TgBIN1* mice are viable with no overt motor phenotypes (movie S1). Crossing *TgBIN1* with *Bin1*<sup>-/-</sup> mice that die at birth from muscle defects (31) efficiently rescued the lethality at birth (table S2). Furthermore, no difference was observed in body weight, TA weight, and specific muscle force between WT and *Bin1*<sup>-/-</sup> *TgBIN1* mice at 4 months (fig. S1, C to I), suggesting that human *BIN1* is functional in a mouse context.

To investigate whether increased expression of BIN1 rescues the survival of *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice, we generated *Mtm1*<sup>-/-</sup> *TgBIN1* mice. Most *Mtm1*<sup>-/-</sup> *TgBIN1* mice survived more than 12 months, and survival was indistinguishable from WT and *TgBIN1* mice (Fig. 1A). There was no difference in body weight between WT, *TgBIN1*, and *Mtm1*<sup>-/-</sup> *TgBIN1* mice throughout their 2-year life span, whereas *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice weighed significantly less before dying ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 1B, fig. S2A, and movie S2). BIN1 expression was increased about fourfold in *TgBIN1* and *Mtm1*<sup>-/-</sup> *TgBIN1* mice compared to WT (Fig. 1, C and D). These results show that increased expression of BIN1 alone is sufficient to rescue the postnatal lethality and growth defects observed in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice.

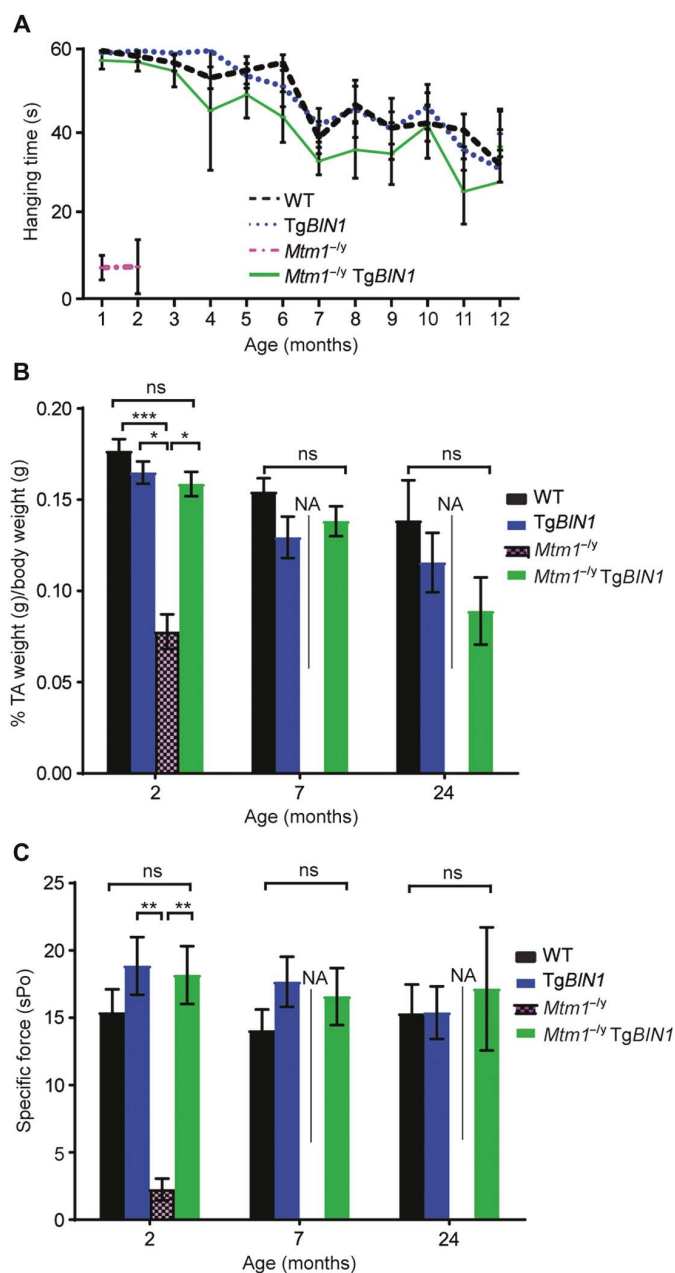
### Increased expression of BIN1 rescues muscle strength and coordination in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice

We next investigated whether muscle strength was rescued in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice by BIN1 expression. At 5 weeks, *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice had strong defects



**Fig. 1. BIN1 overexpression rescues the life span of *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Life span represented as the percentage of survival. (B) Body weight measured at different time points ( $n > 4$ ). (C) Western blot from TA muscles probed with anti-BIN1 and MTM1 antibodies. (D) BIN1 quantification normalized to TCE (2,2,2-trichloroethanol) fluorescence labeling all tryptophan-containing proteins. Statistical analysis: One-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post hoc test were performed for data represented in the graph;  $*P < 0.05$ .

in rotarod (neuromuscular analysis) and footprint (gait analysis) tests, whereas the *Mtm1*<sup>-/-</sup> *TgBIN1* mice performed similarly to WT and *TgBIN1* mice in rotarod, footprint, bar, and grip tests (Fig. 2A and fig. S2, A to E). *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice could not perform the bar test. At 5 months of age, *Mtm1*<sup>-/-</sup> *TgBIN1* were still able to perform all tests (rotarod and footprint), indicating a long-term improvement in their motor function (fig. S2, F and G). *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice had difficulties to perform the hanging test (a test indicating whole-body strength), whereas the *Mtm1*<sup>-/-</sup> *TgBIN1* mice performed similarly to WT.



**Fig. 2. Overexpression of BIN1 rescues muscle force of *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Hanging test. Mice were suspended from a cage lid for a maximum of 60 s, and each mouse repeated the test three times ( $n \geq 4$ ). (B) Weight of TA muscle normalized on total body weight ( $n > 5$ ). (C) Specific muscle force (sPo) of the TA at 2 months ( $n > 5$ ), 7 months ( $n > 5$ ), and 24 months ( $n = 4$ ). NA, not applicable as *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice died before. Statistical analysis: One-way ANOVA and Bonferroni post hoc test were performed for data represented in (A). Nonparametric Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc tests were performed for data represented in (B) and (C). ns, not significant; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Overexpression of BIN1 in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice, which normally present with strong muscle atrophy, rescued the TA muscle atrophy back to WT (Fig. 2B). Specific muscle force, measured in situ in the TA muscle, was extremely low in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice at 2 months and rescued to WT levels in 2-, 7-, and 24-month-old *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 mice (Fig. 2C and fig. S2H). No difference was detected in the muscle force between TgBIN1 and WT mice. The time to muscle exhaustion

during continuous stimulation was similar between *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1, TgBIN1, and WT mice at 2 and 7 months of age (fig. S2I). Overall, the severe muscle weakness phenotype of *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice was fully rescued by increased expression of BIN1 in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice.

### Increased BIN1 rescues histological and ultrastructural defects in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice

At 8 weeks, *Mtm1*<sup>-/-</sup> TA muscles present with small-rounded fibers with abnormal subsarcolemmal and central accumulation of oxidative staining as it was previously described (Fig. 3A and fig. S3A) (18, 19). Fiber size distribution (minimum Feret diameter) was shifted toward smaller fibers (peak diameter, 20 to 25  $\mu\text{m}$ ), whereas it increased from 25 to 30  $\mu\text{m}$  in *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1, similar to WT and TgBIN1 muscles (Fig. 3B and fig. S3, A and B). *Mtm1*<sup>-/-</sup> TA muscles exhibit about 22% of fibers with abnormal nuclei position, whereas *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 were indistinguishable from WT (Fig. 3C). Similar defects in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice were found in other muscles [gastrocnemius (GAS) and diaphragm] and were efficiently rescued in *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 mice (fig. S3, C to F). Later at 7 months of age, no differences were found in TA and GAS muscles between the *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 and WT mice (fig. S3, G to J).

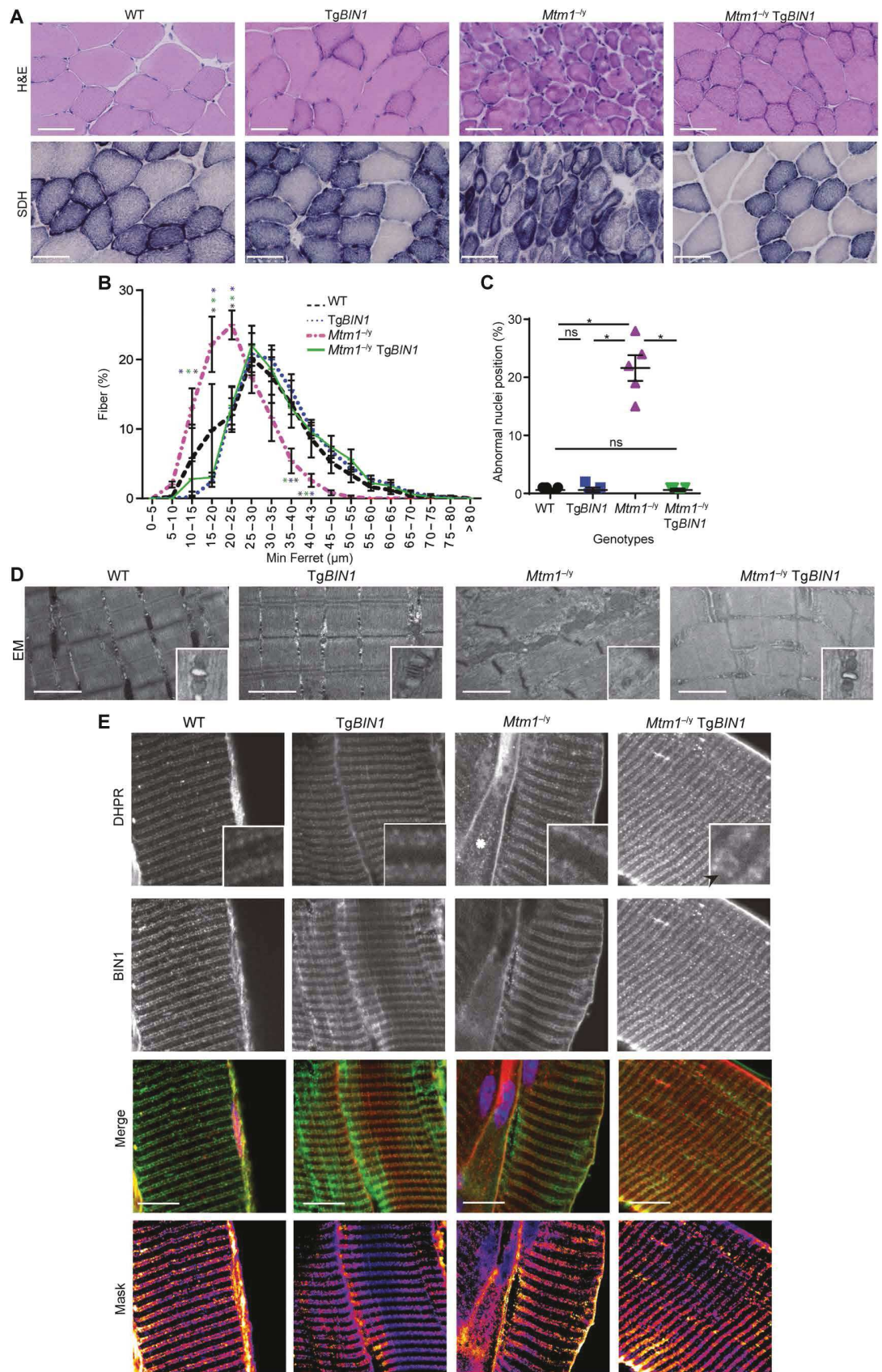
We next investigated myofiber organization by transmission electron microscopy in TA at 8 weeks (Fig. 3D). In contrast to *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice that had misaligned Z lines and general sarcomere disorganization, *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 mice displayed normal myofiber ultrastructure (fig. S3K). Because several studies highlighted an important role for BIN1 in T-tubule biogenesis (8, 12) and because T-tubule defects were observed in several forms of CNMs (32), we next analyzed the triads that are composed of one T-tubule and two sarcoplasmic reticulum cisternae. *Mtm1*<sup>-/-</sup> triads were barely distinguishable (Fig. 3D and fig. S3L). However, normal triads and T-tubule shape and localization were observed in TgBIN1 and *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 mice (fig. S3M). BIN1 and the T-tubule L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel or dihydropyridine receptor (DHPR) colocalized at T-tubules in WT, TgBIN1, and *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 mice, whereas *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice had some fibers with disorganized staining (Fig. 3E and fig. S3N). Overall, increased expression of human BIN1 rescued the muscle atrophy, histopathology, and ultrastructure alterations observed in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice.

### Postnatal muscle overexpression of human BIN1 rescues muscle force and myofiber organization in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice

The expression of BIN1 during development in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice by genetic cross rescued the muscle strength and all CNM hallmarks. We next investigated whether postnatal BIN1 expression was sufficient to rescue the *Mtm1*<sup>-/-</sup> defects. The human BIN1 isoform 8 was the main isoform expressed in the rescued *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 mice and was cloned into AAV serotype 9. AAV-BIN1 was injected intramuscularly in TA muscles of 3-week-old *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice, and analysis was performed 2 or 4 weeks after injection, compared to empty AAV. BIN1 was expressed fourfold higher than in control muscles (Fig. 4A). Two weeks after injection, there was no significant difference in TA muscle weight in *Mtm1*<sup>-/-</sup> injected with AAV-BIN1 and the *Mtm1*<sup>-/-</sup> injected with the AAV Ctrl ( $P = 0.1216$ ; Fig. 4, C and D). Whereas the specific muscle force of *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice injected with the AAV Ctrl was significantly different compared to the WT control ( $P = 0.0056$ ), no difference was detected between the WT and the *Mtm1*<sup>-/-</sup> injected with AAV-BIN1 ( $P = 0.9288$ ; Fig. 4E). AAV-BIN1 greatly improved the general aspect of the muscle (H&E) including fiber size and to a lesser extent nuclei position and the oxidative staining (SDH; Fig. 4, F to H, and fig. S4A). Myofiber organization was improved in

**Fig. 3. BIN1 overexpression rescues muscle histology and ultrastructure in 8-week-old *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice.**

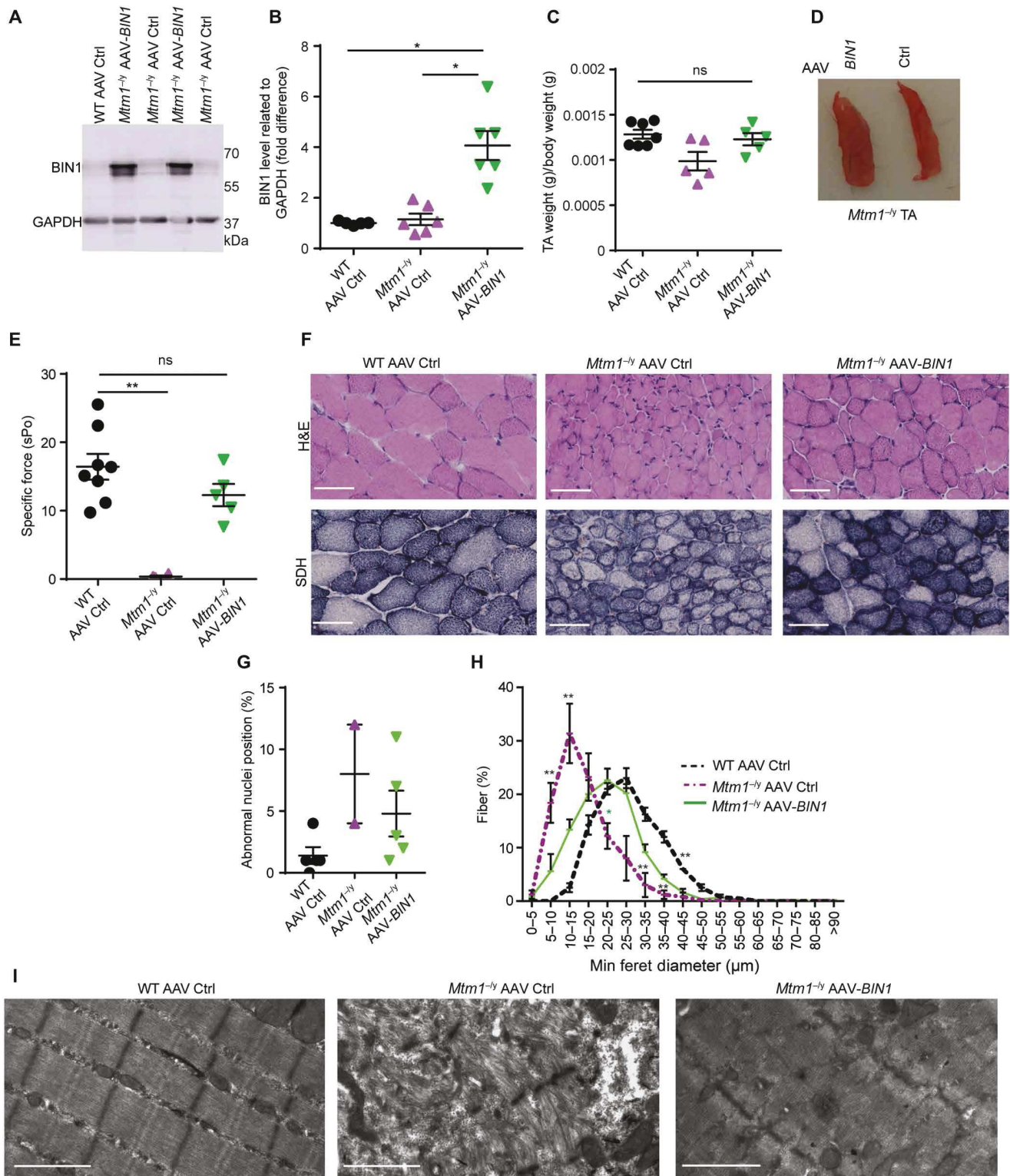
(A) Transversal TA muscle sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) and succinate dehydrogenase (SDH). Scale bars, 50 μm. (B) Diameter of TA fibers grouped into 5-μm intervals (n = 5). (C) Frequency of fibers with abnormal (internalized and centralized) nuclei position in TA (n = 5). (D) TA muscle ultrastructure observed by electron microscopy (EM). Scale bars, 1 μm. High-magnification insert for triads. (E) Longitudinal TA muscle sections stained for DHPR (red) and BIN1 (green). The asterisk indicates disorganized DHPR staining. Images were taken with different laser intensity. Scale bars, 10 μm. Statistical analysis: Nonparametric Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc tests were performed; \*P < 0.05. The black, blue, and green asterisks correspond to the significant difference observed between the *Mtm1*<sup>-/-</sup> group and the WT, *TgBIN1*, or *Mtm1*<sup>-/-</sup> *TgBIN1* groups, respectively.



*Mtm1*<sup>-/-</sup> TA muscles injected with AAV-BIN1 compared with AAV-empty control and WT, and *Mtm1*<sup>-/-</sup> injected with AAV-BIN1 had the same number of triads per sarcomere (Fig. 4I and fig. S4B). Similar effects on improvement of skeletal muscle force and muscle histology were also observed 4 weeks after injection (fig. S4, C to H). Overall, these results show that the intramuscular overexpression of BIN1 after birth is sufficient to improve muscle force and myofiber organization in the *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice. These results suggest that increasing BIN1 postnatally is sufficient to reduce the myopathic phenotype in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice.

**Postnatal systemic overexpression of BIN1 prolongs *Mtm1*<sup>-/-</sup> life span and rescues CNM muscle defects**

Because increasing BIN1 by intramuscular injection of



**Fig. 4. Postnatal intramuscular BIN1 overexpression rescues muscle force and myofiber organization in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Western blot with anti-BIN1 antibody (*n* = 5). (B) Quantification of BIN1 on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). (C) TA muscle weight normalized on total body weight (*n* ≥ 5). (D) Representative photograph of *Mtm1*<sup>-/-</sup> TA muscles injected with AAV-BIN1 (left) or AAV empty control (right) 5 weeks after injection. (E) Specific TA muscle force (*n* ≥ 5). (F) Transversal TA sections stained with H&E and SDH. Scale bars, 50 μm. (G) Frequency of fibers with abnormal (internalized and centralized) nuclei position in TA of WT mice and *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice (*n* ≥ 2). (H) Diameter of TA fibers grouped into 5-μm intervals (*n* ≥ 4). (I) TA muscle ultrastructure observed by electron microscopy (*n* = 1). Scale bars, 1 μm. Statistical analysis: Nonparametric Kruskal-Wallis and Dunn's post hoc tests were performed; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01. The black and green asterisks correspond to the significant difference observed between the WT AAV Ctrl and *Mtm1*<sup>-/-</sup> AAV Ctrl and between *Mtm1*<sup>-/-</sup> AAV-BIN1 and *Mtm1*<sup>-/-</sup> AAV Ctrl, respectively.

AAV-*BIN1* improved CNM features in *Mtm1*<sup>-/-</sup> muscles, we tested whether systemic AAV-*BIN1* transduction after birth could rescue the muscle defects and extend life span of *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice. AAV-*BIN1* or AAV-empty control was injected into pups at postnatal day 1 by intraperitoneal injection, and the effects of the injection were analyzed until 10 weeks of age, an age never reached by untreated *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice. The systemic overexpression of BIN1 after birth rescued the premature death of *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5A). The oldest treated *Mtm1*<sup>-/-</sup> mouse died at 1.5 years old (movie S3). A slight amelioration of body weight was noted for *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice injected with AAV-*BIN1* compared to mice injected with AAV Ctrl (Fig. 5B). In addition, no difference in organ weight (brain, heart, and liver) was observed between *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice injected with AAV-*BIN1* and WT mice at 10 weeks (fig. S5A).

To evaluate whether the positive effect on growth and survival correlated with an increase in muscle function and structure, we dissected TA and GAS muscles. BIN1 overexpression was confirmed in the AAV-*BIN1*-injected animals from TA muscle lysate (Fig. 5, C and D). TA muscle weight relative to body weight of surviving treated *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice was smaller than WT control, whereas no difference was observed in the GAS weight between the WT and the treated *Mtm1*<sup>-/-</sup> (Fig. 5E and fig. S5B). *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice presented a severe TA muscle weakness at 7 weeks of age, whereas no difference was observed in situ in TA absolute or specific muscle force or time to fatigue between *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice injected with AAV-*BIN1* and WT injected with AAV Ctrl at 10 weeks (Fig. 5, F and G, and fig. S5C), indicating a complete rescue in muscle force. We analyzed the histology at 10 weeks when no untreated *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice were alive for direct comparison. In AAV-*BIN1*-treated *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice, the general organization was normal. There was no difference in nuclei position, and most of the fibers had a muscle diameter between 30 and 50  $\mu\text{m}$  as the WT control; however, the number of fibers with diameter between 60 and 95  $\mu\text{m}$  was increased in AAV-*BIN1*-treated *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5, H to J). Furthermore, only an average of 5% of abnormal oxidative staining fibers were counted in the treated *Mtm1*<sup>-/-</sup> (fig. S5D). Ultrastructural analysis revealed that the sarcomere organization was rescued by AAV-*BIN1* injection and the number of triads per sarcomere was normalized, with most triads presenting a normal shape and localization (Fig. 5, K and L). The correct T-tubule organization was confirmed through DHPR and BIN1 immunofluorescence (Fig. 5M and fig. S5E). In conclusion, systemic injection of AAV-*BIN1* extended *Mtm1*<sup>-/-</sup> life span, normalized TA muscle force, and rescued the main histological and ultrastructural defects of the TA muscle.

### Focal adhesion is impaired after loss of *Mtm1* and rescued in mice overexpressing *BIN1*

Hypotrophic (smaller) and rounder fibers with increased interfiber space are the main histological defects in patients with XLCNM (33), suggesting a defect in cell adhesion (Fig. 6A). The *Mtm1*<sup>-/-</sup> mouse faithfully recapitulates these hallmarks. To better understand whether these defects correlate with an increase of extracellular matrix, we stained transverse TA sections from WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice with collagen and laminin, two main components of the extracellular matrix in skeletal muscle (fig. S6A) (34). *Mtm1*<sup>-/-</sup> muscle presented an increased interfiber space occupied by collagen labeled with Masson staining or a specific antibody (Fig. 6, B to D, and fig. S6, A and B). We next quantified the distance between muscle fibers using collagen fluorescence staining. *Mtm1*<sup>-/-</sup> TA muscle presented an increase in the thickness of collagen interfiber staining compared to WT con-

trol (fig. S6C). Proteins from the extracellular matrix connect to proteins of focal adhesion including  $\alpha_7\beta_1$  integrins and adaptor proteins such as vinculin (fig. S6C) (35). In WT, vinculin and integrins localize at the sarcolemma, specifically at the costamere. *Mtm1*<sup>-/-</sup> muscles exhibited internalized vinculin (Fig. 6E and fig. S7, A to C) and  $\beta_1$  integrin (Fig. 6F).

We next investigated whether the modulation of BIN1 expression rescued the localization defects in the extracellular matrix and focal adhesion proteins. The muscle of *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 mice showed a normalization of interfiber space and consequently reduced collagen accumulation between fibers (Fig. 6, G to I), in addition to a rescue in fiber size. We next verified the localization of vinculin and  $\beta_1$  integrin in *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 skeletal muscle. Vinculin and  $\beta_1$  integrin localized on the plasma membrane in *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 as observed in WT (Fig. 6, J and K). Twenty percent of muscle fibers had abnormal  $\beta_1$  integrin localization in *Mtm1*<sup>-/-</sup>, whereas no fibers with abnormal staining were identified in *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 (Fig. 6L).

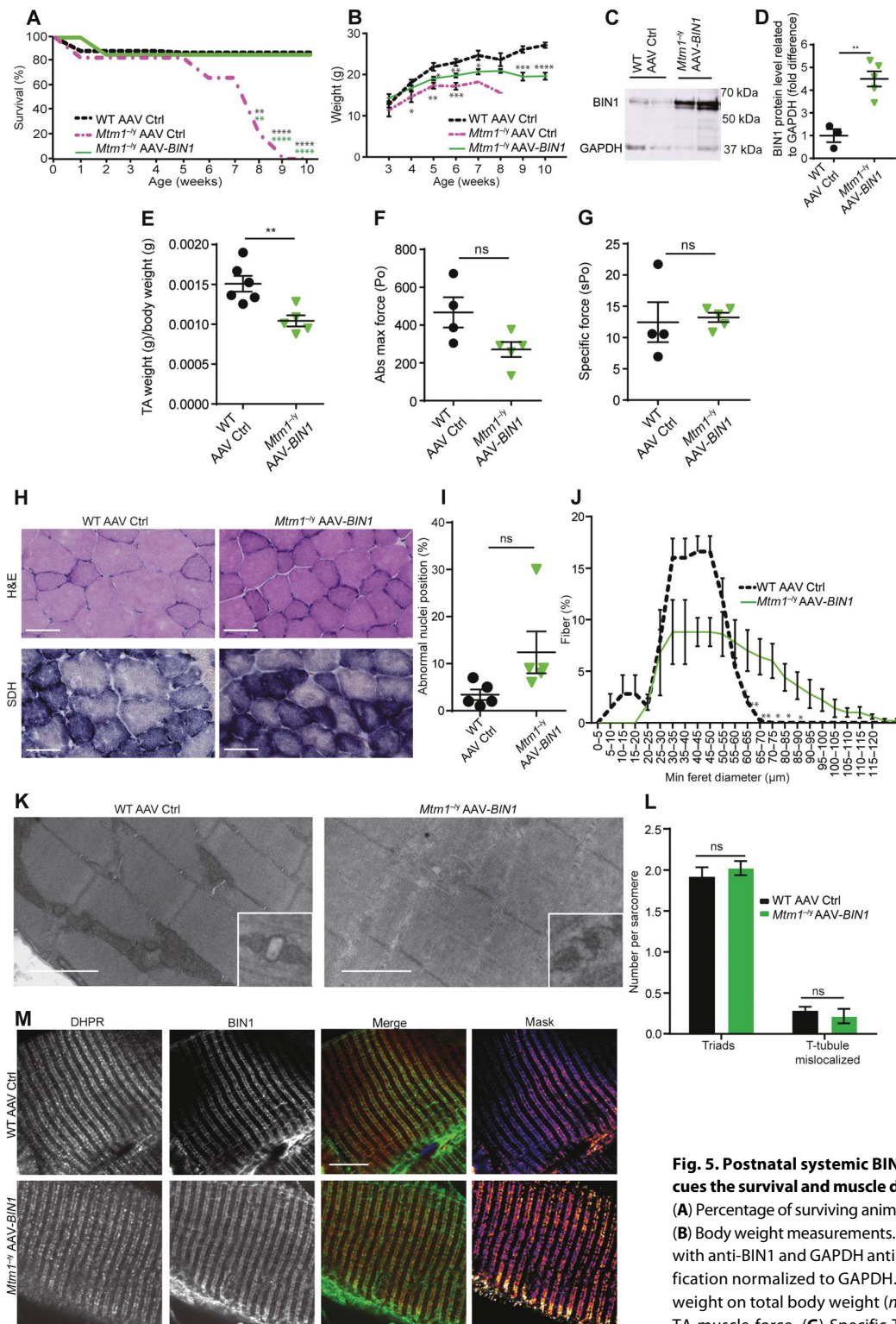
To investigate in which intracellular compartment  $\beta_1$  integrin accumulates, we labeled endosomal markers on muscle sections and found the early endosome marker EEA1 (early endosomal antigen 1) to colocalize with  $\beta_1$  integrin (Fig. 6M and fig. S7, D to E). EEA1-positive endosomes also aggregated in several *Mtm1*<sup>-/-</sup> myofibers compared to WT (fig. S7F). Overall, these results highlight that  $\beta_1$  integrin abnormally accumulates at early endosomes in *Mtm1*<sup>-/-</sup> muscles, indicating a defect in  $\beta_1$  integrin turnover that may induce the abnormality in fiber shape and the increase in interfiber space.

To further decipher the mechanisms responsible for the defects in the focal adhesion pathway, we measured the activation of FAK, a downstream effector of  $\beta_1$  integrin. No difference in FAK protein quantity was detected between the *Mtm1*<sup>-/-</sup> and WT (Fig. 6, N and O). The activation of the focal adhesion complex leads to the autophosphorylation of FAK on tyrosine 397 (Y397) (25). *Mtm1*<sup>-/-</sup> muscles exhibited decreased autophosphorylation of FAK, confirming that activation of the focal adhesion pathway is altered (Fig. 6P). We also verified whether phospho-Y397 (pY397)-FAK was present on endosomes accumulating  $\beta_1$  integrin in *Mtm1*<sup>-/-</sup> skeletal muscle fibers. A colocalization of internalized  $\beta_1$  integrin and pY397-FAK was detected in some *Mtm1*<sup>-/-</sup> fibers, suggesting that  $\beta_1$  integrin signaling was still maintained in endosomes (fig. S7G).

### Consequences in focal adhesion defects in *Mtm1*<sup>-/-</sup> skeletal muscle

To better understand the functional impact of focal adhesion defects observed in skeletal muscle, we conducted experiments on primary myoblasts. *Mtm1*<sup>-/-</sup> myoblasts exhibited larger  $\beta_1$  integrin vesicles than WT myoblasts (Fig. 7A and fig. S7H), confirming the accumulation of  $\beta_1$  integrin observed in adult skeletal muscle. No difference was detected in  $\beta_1$  integrin plasma membrane signal between WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> skeletal muscles (fig. S7I). Focal adhesions are important for cell adhesion, migration, and fusion (27, 28, 36). Cell adhesion was checked by allowing WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> myoblasts to adhere for 10, 20, and 40 min on laminin-coated dishes. The surface area of *Mtm1*<sup>-/-</sup> myoblasts was lower than that of WT cells at 20 min, whereas no difference was detected at 1, 40, and 60 min (Fig. 7B). Because studies showed that defects in  $\beta_1$  integrin localization affected cell migration (36), a migration assay was performed with WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> myoblasts plated on laminin-coated dishes. A significant ( $P = 0.0126$ ) reduction of migrating distance was observed in *Mtm1*<sup>-/-</sup> myoblasts compared to WT (Fig. 7C). Last, the



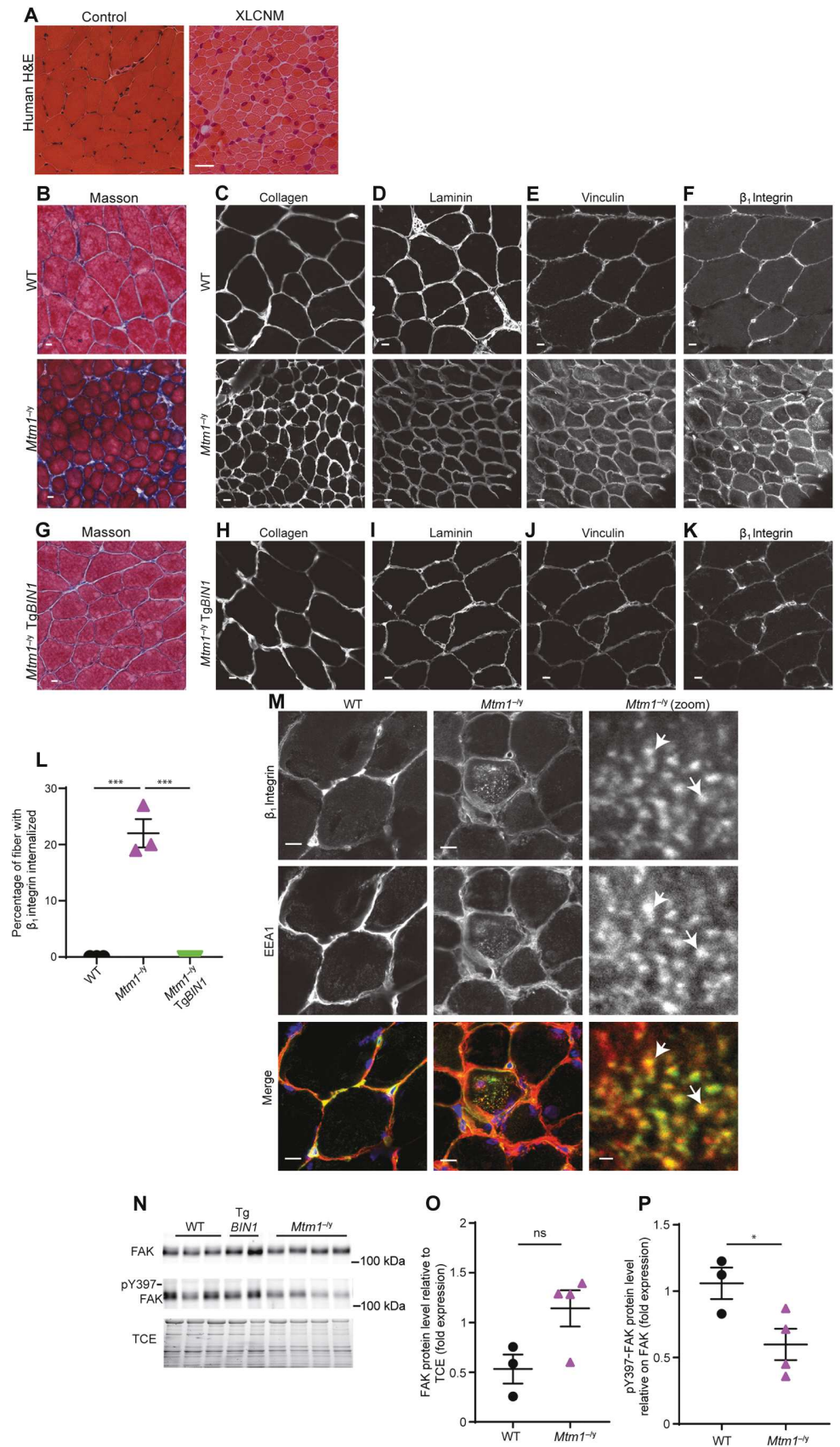


**Fig. 5. Postnatal systemic BIN1 overexpression rescues the survival and muscle defects of *Mtm1*<sup>-ly</sup> mice.** (A) Percentage of surviving animals until 10 weeks of age. (B) Body weight measurements. (C) Western blot probed with anti-BIN1 and GAPDH antibodies. (D) BIN1 quantification normalized to GAPDH. (E) Ratio of TA muscles weight on total body weight ( $n \geq 5$ ). (F) Absolute (Abs) TA muscle force. (G) Specific TA muscle force ( $n \geq 4$ ). (H) Transversal TA muscle sections stained with H&E

and SDH. Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ . (I) Percentage of fibers with abnormal (internalized and centralized) nuclei position ( $n = 5$ ). (J) Minimum Feret of TA fibers grouped into 5- $\mu\text{m}$  intervals ( $n = 5$ ). (K) TA muscle ultrastructure observed by electron microscopy. Scale bars, 1  $\mu\text{m}$ . High-magnification insert for triads. (L) Frequency of triads per sarcomere. (M) Longitudinal TA muscle sections stained with DHPR and BIN1 antibodies. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . Statistical analysis: One-way ANOVA and Tukey's post hoc test were performed in (B) (until 8-week time point), and Student's *t* test was performed in (B) (for 9- and 10-week time points), (C) to (F), (H), and (I); \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ . The black and green asterisks correspond to the significant difference observed between the WT AAV Ctrl and *Mtm1*<sup>-ly</sup> AAV Ctrl and between *Mtm1*<sup>-ly</sup> AAV-BIN1 and *Mtm1*<sup>-ly</sup> AAV Ctrl, respectively.

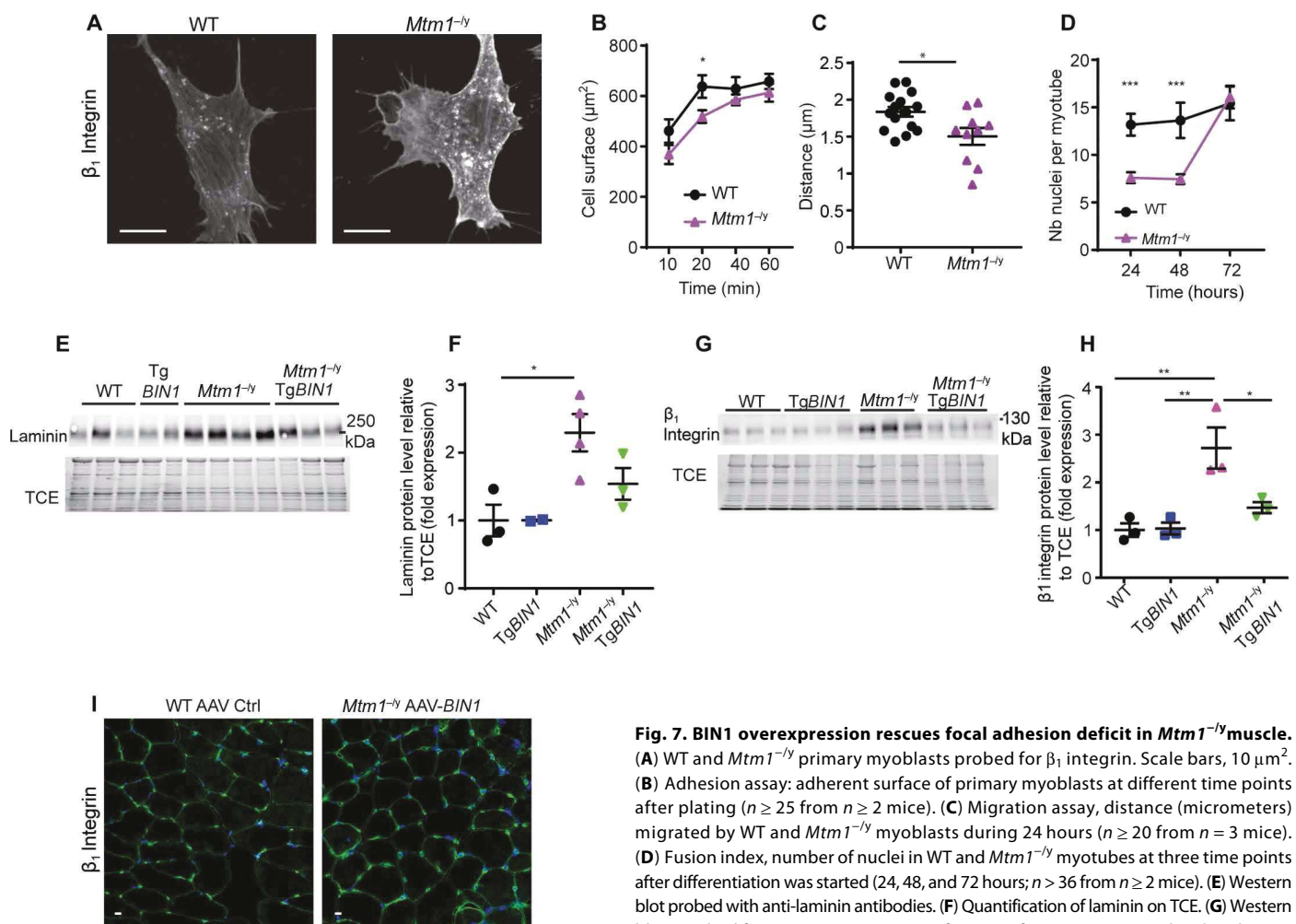
**Fig. 6. MTM1 and BIN1 are essential for  $\beta_1$  integrin trafficking in mammalian muscle.**

(A) Transversal muscle sections from a control human skeletal muscle and a patient with XLCNM (mutation c.141-144delAGAA p.Glu48LeufsX24 in MTM1). Scale bar, 20  $\mu$ m. (B) Eight-week WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> TA muscle stained with Masson trichrome. Scale bar, 10  $\mu$ m. (C to F) Transversal WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> TA muscles stained for the extracellular matrix proteins (C) collagen, (D) laminin, (E) vinculin, and (F)  $\beta_1$  integrin. Scale bars, 10  $\mu$ m. (G) Eight-week transversal *Mtm1*<sup>-/-</sup>TgBIN1 TA muscle sections stained with Masson trichrome. Scale bar, 10  $\mu$ m. (H to K) Transversal WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> TA muscles stained for the extracellular matrix proteins (H) collagen, (I) laminin, (J) vinculin, and (K)  $\beta_1$  integrin. Scale bars, 10  $\mu$ m. (L) Percentage of muscle fibers with  $\beta_1$  integrin internalized. (M) Transversal TA muscle sections stained for  $\beta_1$  integrin (green) and EEA1 (red). Scale bars, 10 and 1  $\mu$ m [for the *Mtm1*<sup>-/-</sup> (zoom) panel]. Arrows point to abnormal intracellular accumulation of  $\beta_1$  integrin on EEA1-positive endosomes. Scale bars, 10 and 1  $\mu$ m (zoom). (N) Western blot probed with anti-FAK and anti-pY397-FAK antibodies. (O) Quantification of FAK on TCE and (P) quantification of pY397-FAK on total FAK. Statistical analysis: One-way ANOVA and Tukey's post hoc test were performed; \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001.



ability of myoblasts to fuse was analyzed over time on Matrigel-coated dishes. A significant (*P* = 0.0001) defect in myoblast fusion was identified at 24 and 48 hours of differentiation in *Mtm1*<sup>-/-</sup> cells but not at 72 hours (Fig. 7D). Overall, these results suggest that *Mtm1*<sup>-/-</sup> myoblasts exhibit defects in cell adhesion, migration, and fusion that are related to a defect in  $\beta_1$  integrin localization and turnover in muscle.

We next analyzed the protein levels of laminin, vinculin, and  $\beta_1$  integrin and found an increase in their amount in the *Mtm1*<sup>-/-</sup> skeletal muscle, which was normalized to WT levels upon BIN1 expression (Fig. 7, E to H, and fig. S7J). *Mtm1*<sup>-/-</sup> skeletal muscle exhibited a higher  $\beta_1$  integrin protein level compared to the WT control. No difference in  $\beta_1$  integrin transcription was identified between WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> skeletal muscles (fig. S7K). We next investigated whether the postnatal overexpression of BIN1 rescued the  $\beta_1$  integrin intracellular accumulation observed in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice. A normalization of  $\beta_1$  integrin localization in *Mtm1*<sup>-/-</sup> muscle



**Fig. 7. BIN1 overexpression rescues focal adhesion deficit in *Mtm1*<sup>-/-</sup> muscle.** (A) WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> primary myoblasts probed for  $\beta_1$  integrin. Scale bars, 10  $\mu\text{m}^2$ . (B) Adhesion assay: adherent surface of primary myoblasts at different time points after plating ( $n \geq 25$  from  $n \geq 2$  mice). (C) Migration assay, distance (micrometers) migrated by WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> myoblasts during 24 hours ( $n \geq 20$  from  $n = 3$  mice). (D) Fusion index, number of nuclei in WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> myotubes at three time points after differentiation was started (24, 48, and 72 hours;  $n > 36$  from  $n \geq 2$  mice). (E) Western blot probed with anti-laminin antibodies. (F) Quantification of laminin on TCE. (G) Western blots probed for  $\beta_1$  integrin. (H) Quantification of  $\beta_1$  integrin normalized to the TCE of the same gel. (I) Transversal TA muscle of WT mice injected systemically with AAV empty as control and *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice injected systemically with AAV-BIN1 and probed with anti- $\beta_1$  integrin antibody. Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ . Statistical analysis: Student's *t* test, one-way ANOVA, and Bonferroni post hoc test were performed; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

of the same gel. (I) Transversal TA muscle of WT mice injected systemically with AAV empty as control and *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice injected systemically with AAV-BIN1 and probed with anti- $\beta_1$  integrin antibody. Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ . Statistical analysis: Student's *t* test, one-way ANOVA, and Bonferroni post hoc test were performed; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

was observed upon AAV-BIN1 systemic injection after birth (Fig. 7I and fig. S7L), suggesting that this rescue was not dependent on the methodology used for BIN1 expression. Overall, BIN1 expression efficiently rescued the defects of extracellular matrix and focal adhesion in addition to the muscle weakness and fiber histopathology in the *Mtm1*<sup>-/-</sup> mouse model of XLCNM.

## DISCUSSION

This study reports a genetic and functional link between MTM1 and BIN1 in skeletal muscle. Increased expression of BIN1 by genetic cross or viral delivery after birth prolongs the life span of *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice and rescued the muscle force and the main histological hallmarks of CNM in this mouse model. *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice showed defects in integrin turnover and focal adhesion functions, myofiber hypotrophy and abnormal shape, and these phenotypes were rescued upon BIN1 overexpression.

Loss-of-function mutations in *BIN1* and *MTM1* cause different forms of CNM (7, 37); however, whether a functional connection existed between these genes was not clear. Although *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice

present with progressive muscle weakness from 2 to 3 weeks of age and die by 2 months (18), increased expression of human BIN1, either by transgenesis or AAV-mediated transduction, rescued the life span, the motor defects, most of the histological and ultrastructural defects, and the molecular alterations. These results show that increasing BIN1 compensates for the lack of MTM1, suggesting that MTM1 and BIN1 might be in a common pathway where MTM1 is a positive regulator of BIN1. Previously, we showed that decreased expression of DNM2, a third protein mutated in CNM, rescued both the CNM phenotypes due to MTM1 or BIN1 loss (31, 38), supporting that MTM1 and BIN1 are negative regulators of DNM2. Together with the present data, we propose a CNM pathway where MTM1 would activate BIN1 that, in turn, inhibits DNM2. This hypothesis is supported by the fact that MTM1 binds BIN1 (16) and that BIN1 is a known interactor of DNM2 (7, 8). In addition, *BIN1* mutations reduce the interaction with MTM1 and act on parallel pathways converging to regulate DNM2. We observed a 1.9-fold increase in BIN1 protein amount in *Mtm1*<sup>-/-</sup> muscle at 8 weeks (advanced disease stage) but normal quantity at 5 weeks, suggesting a potential compensatory mechanism that is insufficient for

reaching a rescue that can be obtained by increasing exogenous BIN1 by about 3.5-fold through transgenesis or AAV injection.

Here, we identified *BIN1* as a modifier for *MTM1*-related CNM and thus *BIN1* as a potential therapeutic target. We showed that *BIN1* expression could rescue the postnatal muscle maintenance defects linked to *MTM1* loss. After the positive proof of concept based on a transgenesis approach, we used AAV delivery of human *BIN1* after birth to validate a potentially translational approach. *BIN1* was first overexpressed intramuscularly and then through systemic delivery, and both strategies rescued muscle force and myofiber structural defects; in addition, the systemic injection greatly prolonged the life span. AAV injection at 3 weeks, after the onset of the disease, was sufficient to reduce disease severity, suggesting that early treatment in symptomatic patients may provide a benefit. The AAV injection does not allow treatment interruption, and it is still not clear how long the AAV-mediated protein expression remains present in the body. In addition, we cannot exclude the possibility of a toxic response to *BIN1* overexpression. In addition, our proof of concept was obtained in mice that differ in size and physiology to human. However, the positive results obtained here using a human *BIN1* transgene in an AAV9 vector, a serotype already used in clinical trial, suggest that this approach could be tested in larger animals that more closely mimic the human condition.

DNM2 modulation also rescued *BIN1* or *MTM1* loss in animal models (31, 39, 40). In this study, we identified an additional “cross-therapy” concept where modulation of a CNM gene (*BIN1*) rescues the loss of another CNM gene (*MTM1*). Moreover, AAV-mediated *MTM1* gene therapy was shown to be effective in animal models of XLCNM and is currently in clinical trials (41). Patients with XLCNM barely express *MTM1* protein, and its delivery might trigger an immune response against an unknown protein. Using AAV-*BIN1* strategy could avoid a potential immune response as in the case of AAV-*MTM1* or the potential secondary effects of DNM2 reduction (42).

Small rounded fibers and increased interfiber space are main histological hallmarks in patients for the diagnosis of XLCNM and suggest a defect of adhesion to the extracellular matrix.  $\beta_1$  Integrin is the major integrin molecule of skeletal muscle and links the extracellular matrix with the intracellular cytoskeleton and the sarcomeres at focal adhesions termed costameres (34). Focal adhesion integrity is important for muscle as they mediate mechanotransduction and are a platform for intracellular signaling (43). Alteration of  $\beta_1$  integrin quantity and localization in muscle was seen in 5- and 8-week-old *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice, together with increased collagen and interfiber space. Correct sarcomere alignment and integrity depends on costameres. Myofibril formation can be inhibited by antagonizing integrin dimers alone, suggesting that integrin–extracellular matrix interaction is important for correct sarcomere formation during muscle development (28). Sarcomeres are greatly altered in XLCNM and *Mtm1*<sup>-/-</sup> muscles, which probably contribute to the severe muscle weakness (33, 44). In addition, a recent report proposed that integrins regulate peripheral nuclear positioning in myofibers differentiated in vitro, suggesting that integrin defects may also mediate the centralization of nuclei in CNM (29). All these defects were rescued by increased *BIN1* expression, supporting that defects in the focal adhesion pathway are an important cause of the disease. *MTM1* and *BIN1* thus appear as important regulators of focal adhesions, in addition to their recognized roles in maintenance of the T-tubule structure (8, 12, 45, 46). Mice that lack  $\beta_1$  integrin specifically in skeletal muscle had reduced muscle mass and alteration of sarcomere ultrastructure and died at birth with noninflated lungs (28); such

phenotypes are typical from patients with XLCNM (1). In addition, compound heterozygous mutations in  $\alpha 7$  integrin cause muscular dystrophy (47). Together, the literature supports the rationale that defects in the functions of focal adhesions are an important component of the pathomechanism leading to the *MTM1*-related myopathy.

Both *MTM1* and *BIN1* are involved in membrane remodeling and recycling in cells (22, 23, 48), and we observed that  $\beta_1$  integrin is blocked in EEA1-positive endosomes in *Mtm1*<sup>-/-</sup> muscles. This defect is potentially due to the fact that *MTM1* is implicated in the conversion of early to late or recycling endosomes (22). This function appears conserved in evolution as a previous study found that the drosophila ortholog of *MTM1* was necessary for integrin turnover (23). In this study, we showed that integrin downstream effectors as vinculin and FAK were altered in *Mtm1*<sup>-/-</sup> muscles, supporting that integrin trafficking defects lead to alteration of focal adhesion signaling. Subsequently, alteration of focal adhesions caused a defect in adhesion, migration, and fusion of myoblasts lacking *MTM1*, leading to a decrease in myoblast-to-myotube fusion index that is reminiscent of the myofibers hypotrophy typically seen in patient’s muscles (33).

Overall, this study underlines a key role for *MTM1* and *BIN1* in the regulation of integrin trafficking and focal adhesion in skeletal muscle and points to the defect in these mechanisms as an important cause of XLCNM that can be efficiently rescued by increasing *BIN1* expression through viral delivery. Because *MTM1* homologs and *BIN1* are implicated in other diseases, especially in peripheral neuropathies or late-onset Alzheimer’s disease and arrhythmia, these findings suggest that a similar mechanism as proposed here might be relevant in other disorders.

## MATERIALS AND METHODS

### Study design

The sample size for each experiment is included in the figure legends. In this study, we used mice (WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> Tg*BIN1* mice) and primary myoblasts obtained from WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> pups. The number of mice used was selected on the basis of previous phenotyping analyses conducted in the same model and calculating the statistical power of the experiment. *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice died before 2 to 3 months of age and were analyzed in this study until 2 months. The other genotypes studied (WT, Tg*BIN1*, *Mtm1*<sup>-/-</sup>, *Mtm1*<sup>-/-</sup> Tg*BIN1*, *Mtm1*<sup>-/-</sup> injected with AAV Ctrl, and *Mtm1*<sup>-/-</sup> injected with AAV-*BIN1* systemically) were phenotyped and euthanized at the ages noted. Blind phenotyping tests were conducted on mice (WT, Tg*BIN1*, *Mtm1*<sup>-/-</sup> Tg*BIN1*, and *Mtm1*<sup>-/-</sup>) and on primary cells. Each phenotyping experiment was repeated at least three times. Sample collection, treatment, and processing information are included in the result section or in other sections of Material and Methods. No outliers were excluded in the study.

### Chemicals

Primary antibodies used were mouse anti-DHPR $\alpha_1$  (Ca<sub>v</sub>1.1) subunit (abcam2862, Abcam), *BIN1* (C99D, Abcam), GAPDH (MAB374, Chemicon),  $\beta_1$  integrin (MAB1997, Chemicon), vinculin (V9131, Sigma-Aldrich), laminin (ab11575, Abcam), collagen VI (NB120-6588, Novus Biologicals), FAK (3285S, Cell Signaling Technology), pY397-FAK (44-624G, Invitrogen), EEA1 (sc-137130, Santa Cruz Biotechnology Inc.), dystrophin (ab15277, Abcam), and rhodamine phalloidin (PHDR1, Cytoskeleton), and anti-*BIN1* (R2405) and rabbit anti-DNM2 antibodies (R2680 and R2865) were made onsite at the polyclonal antibody facility of the Institut de Génétique et de

Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC). Alexa Fluor–conjugated secondary antibodies were purchased from Invitrogen (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, and Alexa Fluor 647). Secondary antibodies against mouse and rabbit immunoglobulin G conjugated with horseradish peroxidase were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (catalog numbers 115-035-146 and 111-036-045). An enhanced chemiluminescence kit was purchased from Pierce.

### Primary myoblasts

Primary myoblasts from WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> newborn mice were prepared as previously described in Cowling *et al.* (31). After extraction, primary cells were plated in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) with 20% fetal calf serum (FCS) and 1% chicken embryo extract (MP Biomedicals) onto 1:200 Matrigel reduced factor (BD Biosciences) and laminin (354232, Corning).

### Primary myoblasts adhesion experiments

The experiments were conducted after the protocol adapted from Ratcliffe *et al.* (36). WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> primary myoblasts were trypsinized and resuspended in IMDM with 20% FCS and 1% chicken embryo extract. Primary myoblasts ( $2.5 \times 10^4$ ) were diluted in 500- $\mu$ l media and plated in laminin-coated dishes. Cells were allowed to adhere for 10, 20, 30, and 60 min. Primary myoblasts were then washed with warmed medium and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA). Immunofluorescence was conducted, and cells were stained with rhodamine phalloidin (Cytoskeleton). After confocal acquisition, cell surface was measured using ImageJ program.

### Primary myoblasts fusion index

Primary myoblasts were plated at  $4 \times 10^4$  on Matrigel. Primary myoblasts differentiation was triggered when cells reach 70% by switching the medium to IMDM with 2% horse serum, and 24 hours later, a thick layer of Matrigel (1:3 in IMDM) was added. Bright-field image was acquired in living myotubes at 24, 48, and 72 hours after differentiation.

### Primary myoblasts migration

Primary myoblasts ( $2 \times 10^4$ ) were plated in IMDM with 20% FCS and 1% chicken embryo extract on laminin-coated dishes. Migration of cells was observed by time lapse with a Leica microscope for 24 hours. Images were taken every 15 min. The migration velocity was measured using Fiji program.

### Mouse lines

*Mtm1*<sup>-/-</sup> mouse line (129PAS) was previously generated and characterized (18, 39). *TgBIN1* (B6) mice were obtained by the insertion of human BAC (no. RP11-437K23; Grch37 chromosome 2: 127761089-127941604) encompassing the full *BIN1* gene with 180.52 kb of genomic sequence. The *Bin1*<sup>+/-</sup> mice were previously published (31). *Mtm1* heterozygous female mice were crossed with *TgBIN1* males to generate four genotypes: WT, *TgBIN1*, *Mtm1*<sup>-/-</sup> *TgBIN1*, and *Mtm1*<sup>-/-</sup>. Animals were maintained at room temperature with 12-hour light/12-hour dark cycle. Animals were euthanized by cervical dislocation following European legislation on animal experimentation and experiments approved by ethical committees (APAFIS #5640-2016061019332648 and 2016031110589922; Com'Eth 01594).

### Animal phenotyping

The phenotyping experiments were conducted blinded, and all the experiments were repeated three times for each mouse to ensure

reproducibility. The tests were performed by the same examiners to avoid stress and to ensure reproducibility. The daily phenotyping experiments were performed at the same time of the day for all the mice in the cohort, whereas the weekly experiments were always performed on the same day of the week. The following phenotyping tests were performed hanging, grip, rotarod, bar, and footprint tests. The hanging test was performed each week from 3 to 16 weeks of age and monthly from 4 to 12 months. The mice were suspended from a cage lid for maximum 60 s, and the test was repeated three times. The average time each mouse fall from the grid is presented in the graph. The grip test was conducted each month from 3 to 12 months. The four-paw strength was measured using a dynamometer, and the test was repeated three times for each animal in each time point. The average of the three repetitions is reported in the graph. Results are represented as force relative to body weight in grams. The rotarod test was conducted at 5 weeks and 5 months of age. The mice performed the test for 5 days. During day 1, mice were trained to run in acceleration mode on the rotarod. From days 2 to 5, mice ran for a maximum of 5 min with increasing speed (4 to 40 rpm). Each mouse performed the test three times, and the average of three repetitions was represented. We did not use the same cohort of mice at 5 weeks and 5 months. The data reported in the graph correspond to the amount of time the animal run on the rotarod. The bar test was performed placing the mice in a suspended bar. The time to walk along the bar was measured, and the experiment was performed only at 5 weeks of age. In this experiment, only WT, *TgBIN1*, and *Mtm1*<sup>-/-</sup> *TgBIN1* mice were tested as *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice could not walk on a suspended bar. The footprint test was performed at 5 weeks and 5 months of age. For this test, the mice hindpaw placement was analyzed as previously described (31). Hindlimbs were colored with ink, and the placement of mouse hindlimbs was recorded. The angle between the hindlimb position was measured using ImageJ.

### Muscle force measurement

Mice were anesthetized using pentobarbital (50 mg/kg) by intraperitoneal injection, and the force of TA was measured using a force transducer (Aurora Scientific) as described previously (39). The absolute maximal force of the TA was measured after tetanic stimulation of the sciatic nerve with a pulse frequency from 1 to 125 Hz. The specific maximal force was determined dividing the absolute maximal force with the TA weight. The fatigue was measured stimulating continuously the sciatic nerve with a frequency of 50 Hz.

### AAV transduction of TA muscle

In intramuscular injection, 3-week-old male WT or *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (20 mg/ml) and 0.4% xylazine (5  $\mu$ l/g of body weight). The TA muscle was injected with 20  $\mu$ l of AAV9 ( $7 \times 10^{11}$  viral genome/ml) cytomegalovirus (CMV) human *BIN1* isoform 8 without exon 17 or empty AAV9 control diluted in phosphate-buffered saline (PBS). In systemic injection, pups were injected intraperitoneally in the first 24 hours after birth. A volume of 50  $\mu$ l of AAV9 ( $10^{13}$  viral genome/ml) CMV human *BIN1* isoform 8 without exon 17 or with empty AAV Ctrl was used (49). The pups were immediately housed in the cage with their mother after the injection.

### Tissue collection

Cervical dislocation was used to euthanize mice after carbon dioxide suffocation. TA and GAS muscles were extracted and then frozen in

isopentane cooled in liquid nitrogen. The diaphragm was collected and directly frozen in Optimal Cutting Temperature compound (OCT) on dry ice. The heart, liver, and brain were collected and directly frozen in liquid nitrogen. All tissues were then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Histology

Eight-micrometer cryosections of TA, GAS, and diaphragm muscles were cut and stained with H&E and SDH for histological analysis. After staining, the images were acquired with the Hamamatsu Nano Zoomer 2HT slide scanner. The percentage of internalized nuclei was counted using cell counter plugin in Fiji software. A macro was used to measure the TA fiber diameter for each genotype. The TA fiber diameter was calculated ( $>100$  fibers per mouse) from three to five mice per group. The percentage of TA muscle fibers with centralized or internalized nuclei was counted in  $>350$  fibers using the cell counter plugin in ImageJ.

### Immunostaining

Transversal 8- $\mu\text{m}$  cryosections were prepared from TA frozen in isopentane. For longitudinal staining, the TA was incubated overnight in PFA at  $4^{\circ}\text{C}$  and, after three  $1\times$  PBS washing, transferred into 30% sucrose overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . After removing the sucrose with PBS washes, muscles were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The sections were permeabilized with 0.5% PBS-Triton X-100 and then saturated with 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS. The primary antibodies diluted in 1% BSA used were as follows: laminin (1:200; ab11575), EEA1 (1:50; sc-137130),  $\alpha_7$  integrin (1:50; ab195959),  $\beta_1$  integrin (1:50; MAB1997), vinculin (1:200; V9131), DHPR (1:50; abcam2862), and BIN1 (1:50; C99D). The secondary antibodies were anti-mouse, -rabbit, or -rat, and Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, and Alexa Fluor 647 were diluted 1:250 in 1% BSA.

### Electron microscopy

TA was stored in 2.5% PFA and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. Sections were observed by electron microscopy. To observe T-tubules, potassium ferrocyanide was added to the buffer [0.8%  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 2% osmium, and 0.1 M cacodylate] (45). The triad number per sarcomere and T-tubule direction were measured manually.

### RNA extraction and BIN1 isoform 8 detection

TA muscles were lysed in TRIzol reagent (Invitrogen) to extract RNA, and the reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) was used to obtain complementary DNA (cDNA). To identify human *BIN1* isoform overexpressed in *Mtm1<sup>-/-</sup> TgBIN1* mice, *BIN1* cDNA was amplified using human *BIN1* primers (5'-ACGGCGGAAAGATCGCCAG and 3'-TTGTGCTGGTCCAGTCGCT). Human *BIN1* cDNAs were cloned into pENTR1A vector and then sequenced using Eurofins Genomics Europe Sequencing laboratory (Eurofins GATC) service.

### Protein extraction and Western blotting

TA muscle was lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer with 1 mM dimethyl sulfoxide, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics) on ice. The protein concentration was measured using the Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad). Loading buffer (50 mM Tris-HCl, 2% SDS, and 10% glycerol) was added to protein lysates, and proteins were separated by 8 or 10% in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis containing TCE to visualize all tryptophan-containing proteins. After transfer to nitrocellulose, saturation was performed

with 3% BSA or 5% milk, and primary and secondary antibodies were added as follows:  $\beta_1$  integrin (1:500; MAB1997), vinculin (1:1000; V9131), BIN1 (1:1000; 2405, IGBMC), MTM1 (1:1000; 2827, IGBMC), and GAPDH (1:100,000; MAB374).

### Statistical analysis

The data are expressed as means  $\pm$  SEM. Graph and curves were made using GraphPad Prism software versions 5 and 6. The unpaired Student's *t* test was used to compare two groups. Nonparametric and Kruskal-Wallis or Dunn's post hoc tests were used to compare multiple groups. One-way ANOVA and Bonferroni or Tukey's post hoc test were used to compare different groups if the data followed a normal distribution and if the samples analyzed had the same genetic background. *P* values smaller than 0.05 were considered significant. The number of mice and the tests used for each experiment are listed for each experiment in the figure legends.

### SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/11/484/eaav1866/DC1

Fig. S1. Creation of transgenic mice expressing human BIN1 (TgBIN1 mouse).

Fig. S2. Increased BIN1 expression rescues the motor function and muscle force of *Mtm1<sup>-/-</sup>* mice.

Fig. S3. Increased BIN1 expression rescues muscle histology of *Mtm1<sup>-/-</sup>* mice at 2 and 7 months old.

Fig. S4. Postnatal intramuscular overexpression of BIN1 rescues muscle force and myofiber organization in *Mtm1<sup>-/-</sup>* mice.

Fig. S5. Organ weights and muscle fatigue in the *Mtm1<sup>-/-</sup>* mice expressing BIN1 after systemic AAV delivery.

Fig. S6. Extracellular matrix defects in *Mtm1<sup>-/-</sup>* muscle.

Fig. S7. Focal adhesion defects in *Mtm1<sup>-/-</sup>* myofibers.

Table S1. Breeding strategy and outcome for *Mtm1<sup>-/-</sup>  $\times$  Bin1<sup>-/-</sup>* with expected mice and obtained at E18.5 and 10 days after birth.

Table S2. Breeding strategy and outcome for *Bin1<sup>-/-</sup>  $\times$  Bin1<sup>-/-</sup> TgBIN1* with expected mice and obtained at E18.5 and 10 days after birth.

Table S3. Raw data (Excel file).

Movie S1. Expression of human *BIN1* did not generate any obvious clinical phenotypes in mice.

Movie S2. Increased *BIN1* expression rescues *Mtm1<sup>-/-</sup>* phenotype.

Movie S3. Postnatal systemic injection of AAV-BIN1 rescued *Mtm1<sup>-/-</sup>* mice phenotypes.

### REFERENCES AND NOTES

- H. Jungbluth, C. Wallgren-Pettersson, J. Laporte, Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J. Rare Dis.* **3**, 26 (2008).
- J. Laporte, L. J. Hu, C. Kretz, J.-L. Mandel, P. Kioschis, J. F. Coy, S. M. Klauk, A. Poustka, N. Dahl, A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.* **13**, 175–182 (1996).
- F. Blondeau, J. Laporte, S. Bodin, G. Superti-Furga, B. Payrastre, J.-L. Mandel, Myotubularin, a phosphatase deficient in myotubular myopathy, acts on phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 3-phosphate pathway. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2223–2229 (2000).
- 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).
- M. A. Raess, S. Friant, B. S. Cowling, J. Laporte, WANTED—Dead or alive: Myotubularins, a large disease-associated protein family. *Adv. Biol. Regul.* **63**, 49–58 (2017).
- J. Böhm, V. Biancalana, E. Malfatti, N. Dondaine, C. Koch, N. Vasli, W. Kress, M. Strittmatter, A. L. Taratuto, H. Gonorazky, P. Laforêt, T. Maisonobe, M. Olivé, L. Gonzalez-Mera, M. Fardeau, N. Carrière, P. Clavelou, B. Eymard, M. Bitoun, J. Rendu, J. Fauré, J. Weis, J.-L. Mandel, N. B. Romero, J. Laporte, Adult-onset autosomal dominant centronuclear myopathy due to *BIN1* mutations. *Brain* **137**, 3160–3170 (2014).
- A.-S. Nicot, A. Toussaint, V. Tosch, C. Kretz, C. Wallgren-Pettersson, E. Iwarsson, H. Kingston, J.-M. Garnier, V. Biancalana, A. Oldfors, J.-L. Mandel, J. Laporte, Mutations in amphiphysin 2 (*BIN1*) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* **39**, 1134–1139 (2007).
- E. Lee, M. Marcucci, L. Daniell, M. Pypaert, O. A. Weisz, G.-C. Ochoa, K. Farsad, M. R. Wenk, P. De Camilli, Amphiphysin 2 (*Bin1*) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* **297**, 1193–1196 (2002).
- B. J. Peter, H. M. Kent, I. G. Mills, Y. Vallis, P. J. G. Butler, P. R. Evans, H. T. McMahon, BAR domains as sensors of membrane curvature: The amphiphysin BAR structure. *Science* **303**, 495–499 (2004).

10. I. Prokic, B. S. Cowling, J. Laporte, Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J. Mol. Med. (Berl.)* **92**, 453–463 (2014).
11. O. Daumke, A. Roux, V. Haucke, BAR domain scaffolds in dynamin-mediated membrane fission. *Cell* **156**, 882–892 (2014).
12. A. Razzaq, I. M. Robinson, H. T. McMahon, J. N. Skepper, Y. Su, A. C. Zelfhof, A. P. Jackson, N. J. Gay, C. J. O’Kane, Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev.* **15**, 2967–2979 (2001).
13. P. Wigge, K. Köhler, Y. Vallis, C. A. Doyle, D. Owen, S. P. Hunt, H. T. McMahon, Amphiphysin heterodimers: Potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2003–2015 (1997).
14. H. T. McMahon, P. Wigge, C. Smith, Clathrin interacts specifically with amphiphysin and is displaced by dynamin. *FEBS Lett.* **413**, 319–322 (1997).
15. M. D’Alessandro, K. Hnia, V. Gache, C. Koch, C. Gavriilidis, D. Rodriguez, A.-S. Nicot, N. B. Romero, Y. Schwab, E. Gomes, M. Labouesse, J. Laporte, Amphiphysin 2 orchestrates nucleus positioning and shape by linking the nuclear envelope to the actin and microtubular cytoskeleton. *Dev. Cell* **35**, 186–198 (2015).
16. B. Royer, K. Hnia, C. Gavriilidis, H. Tronchère, V. Tosch, J. Laporte, The myotubularin-amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO Rep.* **14**, 907–915 (2013).
17. N. B. Romero, Centronuclear myopathies: A widening concept. *Neuromuscul. Disord.* **20**, 223–228 (2010).
18. A. Buj-Bello, V. Laugel, N. Messaddeq, H. Zahreddine, J. Laporte, J.-F. Pellissier, J.-L. Mandel, The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 15060–15065 (2002).
19. M. W. Lawlor, A. H. Beggs, A. Buj-Bello, M. K. Childers, J. J. Dowling, E. S. James, H. Meng, S. A. Moore, S. Prasad, B. Schooser, C. A. Sewry, Skeletal muscle pathology in X-linked myotubular myopathy: Review with cross-species comparisons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **75**, 102–110 (2016).
20. Z. Sun, S. S. Guo, R. Fässler, Integrin-mediated mechanotransduction. *J. Cell Biol.* **215**, 445–456 (2016).
21. U. Mayer, Integrins: Redundant or important players in skeletal muscle? *J. Biol. Chem.* **278**, 14587–14590 (2003).
22. K. Ketel, M. Krauss, A.-S. Nicot, D. Puchkov, M. Wiewfer, R. Müller, D. Subramanian, C. Schultz, J. Laporte, V. Haucke, A phosphoinositide conversion mechanism for exit from endosomes. *Nature* **529**, 408–412 (2016).
23. 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).
24. I. D. Campbell, M. J. Humphries, Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004994 (2011).
25. Z. A. Graham, P. M. Gallagher, C. P. Cardozo, Focal adhesion kinase and its role in skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **36**, 305–315 (2015).
26. J. Alanko, J. Ivaska, Endosomes: Emerging platforms for integrin-mediated FAK signalling. *Trends Cell Biol.* **26**, 391–398 (2016).
27. A. D. Perkins, S. J. Ellis, P. Asghari, A. Shamsian, E. D. W. Moore, G. Tanentzapf, Integrin-mediated adhesion maintains sarcomeric integrity. *Dev. Biol.* **338**, 15–27 (2010).
28. M. Schwander, M. Leu, M. Stumm, O. M. Dorchie, U. T. Ruegg, J. Schittny, U. Müller,  $\beta 1$  integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev. Cell* **4**, 673–685 (2003).
29. W. Roman, J. P. Martins, E. R. Gomes, Local arrangement of fibronectin by myofibroblasts governs peripheral nuclear positioning in muscle cells. *Dev. Cell* **46**, 102–111.e6 (2018).
30. R. J. Bloch, H. Gonzalez-Serratos, Lateral force transmission across costameres in skeletal muscle. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **31**, 73–78 (2003).
31. B. S. Cowling, I. Prokic, H. Tasfaout, A. Rabai, F. Humbert, B. Rinaldi, A.-S. Nicot, C. Kretz, S. Friant, A. Roux, J. Laporte, Amphiphysin (BIN1) negatively regulates dynamin 2 for normal muscle maturation. *J. Clin. Invest.* **127**, 4477–4487 (2017).
32. A. Toussaint, B. S. Cowling, K. Hnia, M. Mohr, A. Oldfors, Y. Schwab, U. Yis, T. Maisonobe, T. Stojkovic, C. Wallgren-Pettersson, V. Laugel, A. Echaniz-Laguna, J.-L. Mandel, I. Nishino, J. Laporte, Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies. *Acta Neuropathol.* **121**, 253–266 (2011).
33. N. B. Romero, M. Bitoun, Centronuclear myopathies. *Semin. Pediatr. Neurol.* **18**, 250–256 (2011).
34. V. Carmignac, M. Durbeej, Cell-matrix interactions in muscle disease. *J. Pathol.* **226**, 200–218 (2012).
35. D. S. Harburger, D. A. Calderwood, Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 159–163 (2009).
36. C. D. H. Ratcliffe, P. Sahgal, C. A. Parachoniak, J. Ivaska, M. Park, Regulation of cell migration and  $\beta 1$  integrin trafficking by the endosomal adaptor GGA3. *Traffic* **17**, 670–688 (2016).
37. J. Laporte, V. Biancalana, S. M. Tanner, W. Kress, V. Schneider, C. Wallgren-Pettersson, F. Heger, A. Buj-Bello, F. Blondeau, S. Liechti-Gallati, J.-L. Mandel, MTM1 mutations in X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mutat.* **15**, 393–409 (2000).
38. B. S. Cowling, T. Chevremont, I. Prokic, C. Kretz, A. Ferry, C. Coirault, O. Koutsopoulos, V. Laugel, N. B. Romero, J. Laporte, Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J. Clin. Invest.* **124**, 1350–1363 (2014).
39. H. Tasfaout, S. Buono, S. Guo, C. Kretz, N. Messaddeq, S. Booten, S. Greenlee, B. P. Monia, B. S. Cowling, J. Laporte, Antisense oligonucleotide-mediated *Dnm2* knockdown prevents and reverts myotubular myopathy in mice. *Nat. Commun.* **8**, 15661 (2017).
40. H. Tasfaout, V. M. Lionello, C. Kretz, P. Koebel, N. Messaddeq, D. Bitz, J. Laporte, B. S. Cowling, Single intramuscular injection of AAV-shRNA reduces DNM2 and prevents myotubular myopathy in mice. *Mol. Ther.* **26**, 1082–1092 (2018).
41. M. K. Childers, R. Joubert, K. Poulard, C. Moal, R. W. Grange, J. A. Doering, M. W. Lawlor, B. E. Rider, T. Jamet, N. Danièle, S. Martin, C. Rivière, T. Soker, C. Hammer, L. Van Wittenbergh, M. Lockard, X. Guan, M. Goddard, E. Mitchell, J. Barber, J. K. Williams, D. L. Mack, M. E. Furth, A. Vignaud, C. Masurier, F. Mavilio, P. Moullet, A. H. Beggs, A. Buj-Bello, Gene therapy prolongs survival and restores function in murine and canine models of myotubular myopathy. *Sci. Transl. Med.* **6**, 220ra10 (2014).
42. H. Tasfaout, B. S. Cowling, J. Laporte, Centronuclear myopathies under attack: A plethora of therapeutic targets. *J. Neuromuscul. Dis.* **5**, 387–406 (2018).
43. L. A. Olsen, J. X. Nicoll, A. C. Fry, The skeletal muscle fiber: A mechanically sensitive cell. *Eur. J. Appl. Physiol.* **119**, 333–349 (2019).
44. B. S. Cowling, A. Toussaint, J. Muller, J. Laporte, Defective membrane remodeling in neuromuscular diseases: Insights from animal models. *PLoS Genet.* **8**, e1002595 (2012).
45. L. Al-Qusairi, N. Weiss, A. Toussaint, C. Berbey, N. Messaddeq, C. Kretz, D. Sanoudou, A. H. Beggs, B. Allard, J.-L. Mandel, J. Laporte, V. Jacquemond, A. Buj-Bello, T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 18763–18768 (2009).
46. J. J. Dowling, A. P. Vreede, S. E. Low, E. M. Gibbs, J. Y. Kuwada, C. G. Bonnemann, E. L. Feldman, Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet.* **5**, e1000372 (2009).
47. Y. K. Hayashi, F.-L. Chou, E. Engvall, M. Ogawa, C. Matsuda, S. Hirabayashi, K. Yokochi, B. L. Ziober, R. H. Kramer, S. J. Kaufman, E. Ozawa, Y.-i. Goto, I. Nonaka, T. Tsukahara, J.-z. Wang, E. P. Hoffman, K. Arahata, Mutations in the integrin  $\alpha 7$  gene cause congenital myopathy. *Nat. Genet.* **19**, 94–97 (1998).
48. S. Pant, M. Sharma, K. Patel, S. Caplan, C. M. Carr, B. D. Grant, AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1399–1410 (2009).
49. C. Long, L. Amosii, A. A. Mireault, J. R. McAnally, H. Li, E. Sanchez-Ortiz, S. Bhattacharyya, J. M. Shelton, R. Bassel-Duby, E. N. Olson, Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science* **351**, 400–403 (2016).

**Acknowledgments:** We thank the imaging, animal, and histological platforms of the IGBMC for help and F. Saudou for support. **Funding:** This study was supported by INSERM, CNRS, University of Strasbourg, ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the ANR under the frame program Investissements d’Avenir (10-IDEX-0002), Myotubular Trust, and Sparks the Children’s Medical Research Charity. **Author contributions:** B.S.C., A.-S.N., and J.L. designed and supervised the research. V.M.L., A.-S.N., M.S., C.K., S.B., S.D., I.P., N.M., and N.B.R. performed the research. V.M.L. performed the animal characterization, injections, protein immunofluorescence, and primary myoblast experiments. A.-S.N. performed the protein quantity analysis by Western blot. M.S. and I.P. characterized the *Bin1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 mice. C.K. and S.B. performed the mice genotyping and helped with animal phenotyping tests. S.D. contributed to primary myoblasts extraction. N.M. acquired electron microscopy images. N.B.R. provided the Masson staining on human skeletal muscle. P. Kessler, P. Koebel, and Y.H. provided materials and analysis tools. P. Kessler designed a macro to analyze fiber size. P. Koebel generated the AAVs to inject in mice. Y.H. provided the TgBIN1 mice. V.M.L., A.-S.N., B.S.C., and J.L. analyzed data. V.M.L., B.S.C., and J.L. wrote the paper. **Competing interests:** V.M.L., B.S.C., and J.L. submitted a patent on the rescue of XLNCM by BIN1 modulation, which is entitled “Compositions and methods for the treatment of X-linked centronuclear myopathy,” the European patent filing number is 17 306 566.5, and the initial submission date was 11 November 2017. B.S.C. and J.L. are cofounders of Dynacure. B.S.C. is now a Dynacure employee (Dynacure, 67400 Illkirch, France). J.L. is a scientific advisor for Dynacure. All other authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All the data used for this study are included in the main text or in the Supplementary Materials. The AAV serotype 9 used in this study was received from the University of Pennsylvania under a material transfer agreement.

Submitted 22 August 2018  
Resubmitted 14 November 2018  
Accepted 28 February 2019  
Published 20 March 2019  
10.1126/scitranslmed.aav1866

**Citation:** V. M. Lionello, A.-S. Nicot, M. Sartori, C. Kretz, P. Kessler, S. Buono, S. Djerroud, N. Messaddeq, P. Koebel, I. Prokic, Y. Héroult, N. B. Romero, J. Laporte, B. S. Cowling, Amphiphysin 2 modulation rescues myotubular myopathy and prevents focal adhesion defects in mice. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaav1866 (2019).

## Amphiphysin 2 modulation rescues myotubular myopathy and prevents focal adhesion defects in mice

Valentina M. Lionello, Anne-Sophie Nicot, Maxime Sartori, Christine Kretz, Pascal Kessler, Suzie Buono, Sarah Djerroud, Nadia Messaddeq, Pascale Koebel, Ivana Prokic, Yann Hérault, Norma B. Romero, Jocelyn Laporte and Belinda S. Cowling

*Sci Transl Med* 11, eaav1866.  
DOI: 10.1126/scitranslmed.aav1866

### A muscle-building interaction

Centronuclear myopathies (CNMs) are rare genetic disorders characterized by severe muscle weakness. Mutations in myotubularin 1 (MTM1) and in amphiphysin 2 (BIN1) are responsible for two different forms of the disease. BIN1 and MTM1 have been shown to interact in skeletal muscles. Now, Lionello *et al.* investigated the role of this interaction in a model of *Mtm1*-mediated CNM. Postnatal BIN1 overexpression improved survival and muscle strength in *Mtm1* knockout mice. The treatment also restored myofiber integrity and rescued extracellular matrix and focal adhesion defects in myofibers. The results suggest that BIN1-MTM1 interaction plays a role in CNM and could be targeted for treating CNM due to MTM1 mutations.

ARTICLE TOOLS	<a href="http://stm.sciencemag.org/content/11/484/eaav1866">http://stm.sciencemag.org/content/11/484/eaav1866</a>
SUPPLEMENTARY MATERIALS	<a href="http://stm.sciencemag.org/content/suppl/2019/03/18/11.484.eaav1866.DC1">http://stm.sciencemag.org/content/suppl/2019/03/18/11.484.eaav1866.DC1</a>
RELATED CONTENT	<a href="http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/6/220/220ra10.full">http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/6/220/220ra10.full</a> <a href="http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/8/331/331ra41.full">http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/8/331/331ra41.full</a> <a href="http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/12/535/eaax1744.full">http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/12/535/eaax1744.full</a>
REFERENCES	This article cites 49 articles, 14 of which you can access for free <a href="http://stm.sciencemag.org/content/11/484/eaav1866#BIBL">http://stm.sciencemag.org/content/11/484/eaav1866#BIBL</a>
PERMISSIONS	<a href="http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions">http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions</a>

Use of this article is subject to the [Terms of Service](#)

---

*Science Translational Medicine* (ISSN 1946-6242) is published by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. The title *Science Translational Medicine* is a registered trademark of AAAS.

Copyright © 2019 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works



## Supplementary Materials for

### Amphiphysin 2 modulation rescues myotubular myopathy and prevents focal adhesion defects in mice

Valentina M. Lionello, Anne-Sophie Nicot, Maxime Sartori, Christine Kretz, Pascal Kessler, Suzie Buono, Sarah Djerroud, Nadia Messaddeq, Pascale Koebel, Ivana Prokic, Yann Hérault, Norma B. Romero, Jocelyn Laporte\*, Belinda S. Cowling

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

Published 20 March 2019, *Sci. Transl. Med.* **11**, eaav1866 (2019)  
DOI: 10.1126/scitranslmed.aav1866

#### The PDF file includes:

- Fig. S1. Creation of transgenic mice expressing human BIN1 (TgBIN1 mouse).
- Fig. S2. Increased BIN1 expression rescues the motor function and muscle force of *Mtm1<sup>-/y</sup>* mice.
- Fig. S3. Increased BIN1 expression rescues muscle histology of *Mtm1<sup>-/y</sup>* mice at 2 and 7 months old.
- Fig. S4. Postnatal intramuscular overexpression of BIN1 rescues muscle force and myofiber organization in *Mtm1<sup>-/y</sup>* mice.
- Fig. S5. Organ weights and muscle fatigue in the *Mtm1<sup>-/y</sup>* mice expressing BIN1 after systemic AAV delivery.
- Fig. S6. Extracellular matrix defects in *Mtm1<sup>-/y</sup>* muscle.
- Fig. S7. Focal adhesion defects in *Mtm1<sup>-/y</sup>* myofibers.
- Table S1. Breeding strategy and outcome for *Mtm1<sup>-/y</sup> × Bin1<sup>-/+</sup>* with expected mice and obtained at E18.5 and 10 days after birth.
- Table S2. Breeding strategy and outcome for *Bin1<sup>-/+</sup> × Bin1<sup>-/+</sup> TgBIN1* with expected mice and obtained at E18.5 and 10 days after birth.
- Legend for table S3
- Legends for movies S1 to S3

**Other Supplementary Material for this manuscript includes the following:**

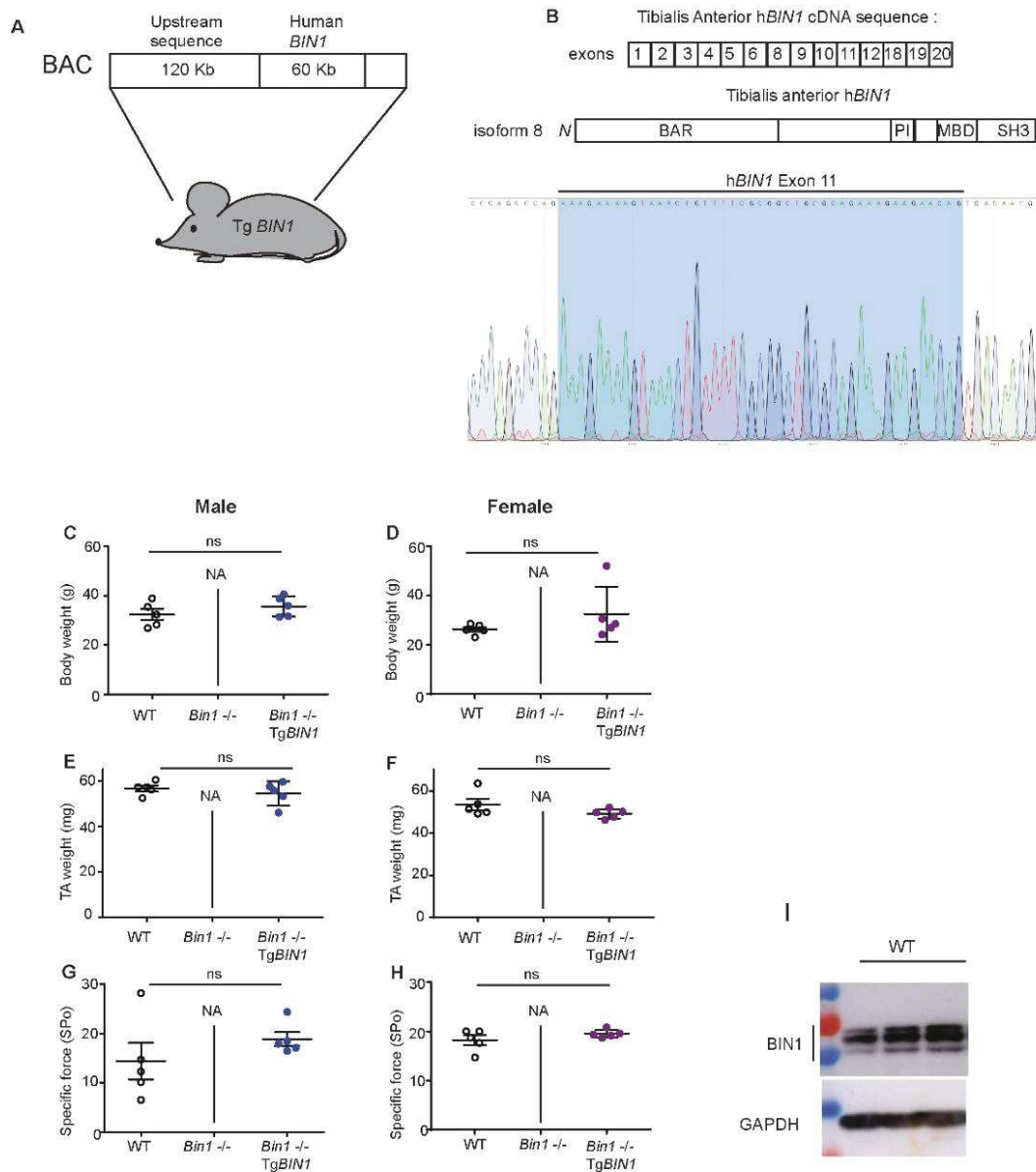
(available at [www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/11/484/eaav1866/DC1](http://www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/11/484/eaav1866/DC1))

Table S3. Raw data (Excel file).

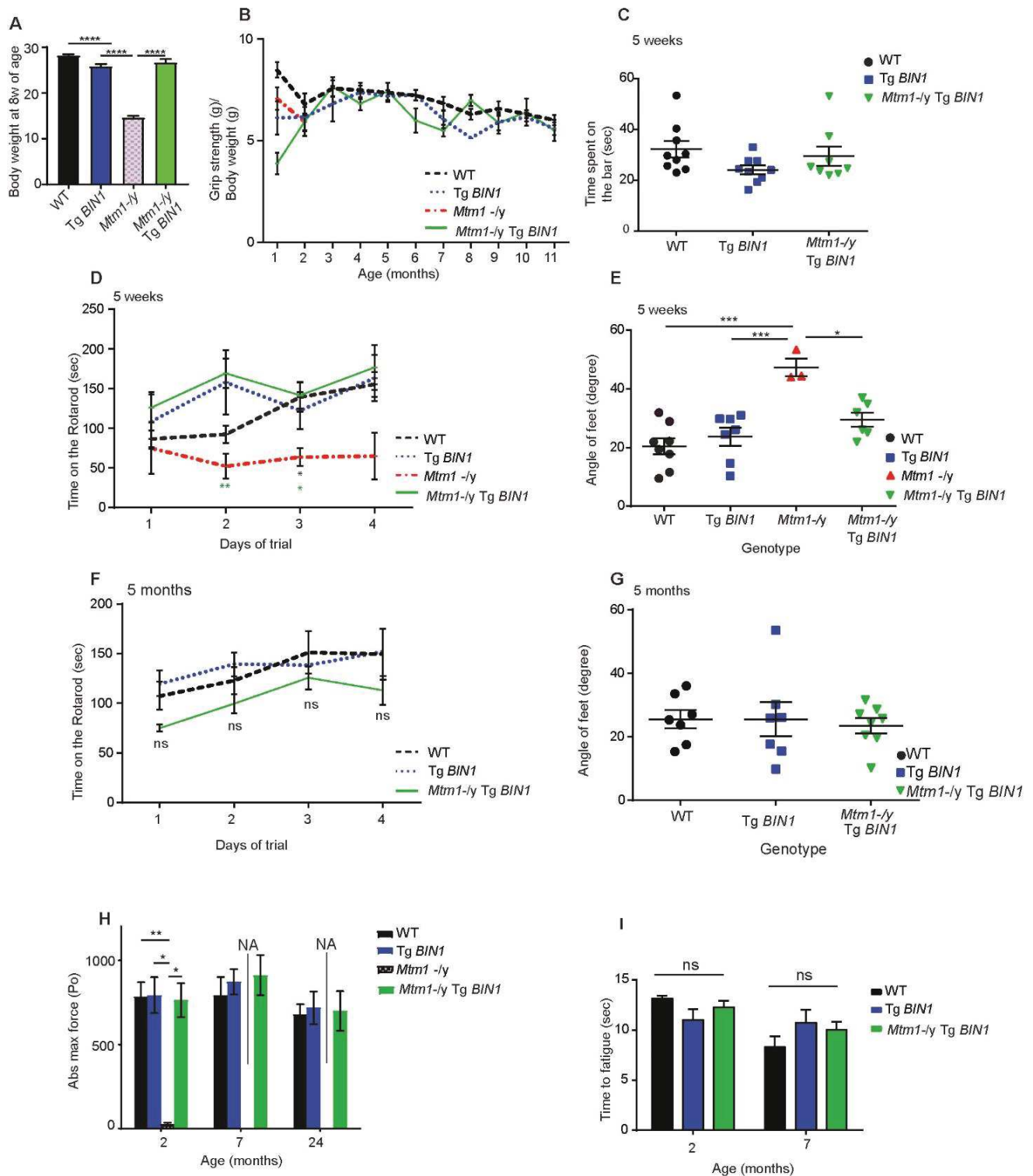
Movie S1 (.mp4 format). Expression of human *BINI* did not generate any obvious clinical phenotypes in mice.

Movie S2 (.mp4 format). Increased *BINI* expression rescues *Mtm1*<sup>-/-</sup> phenotype.

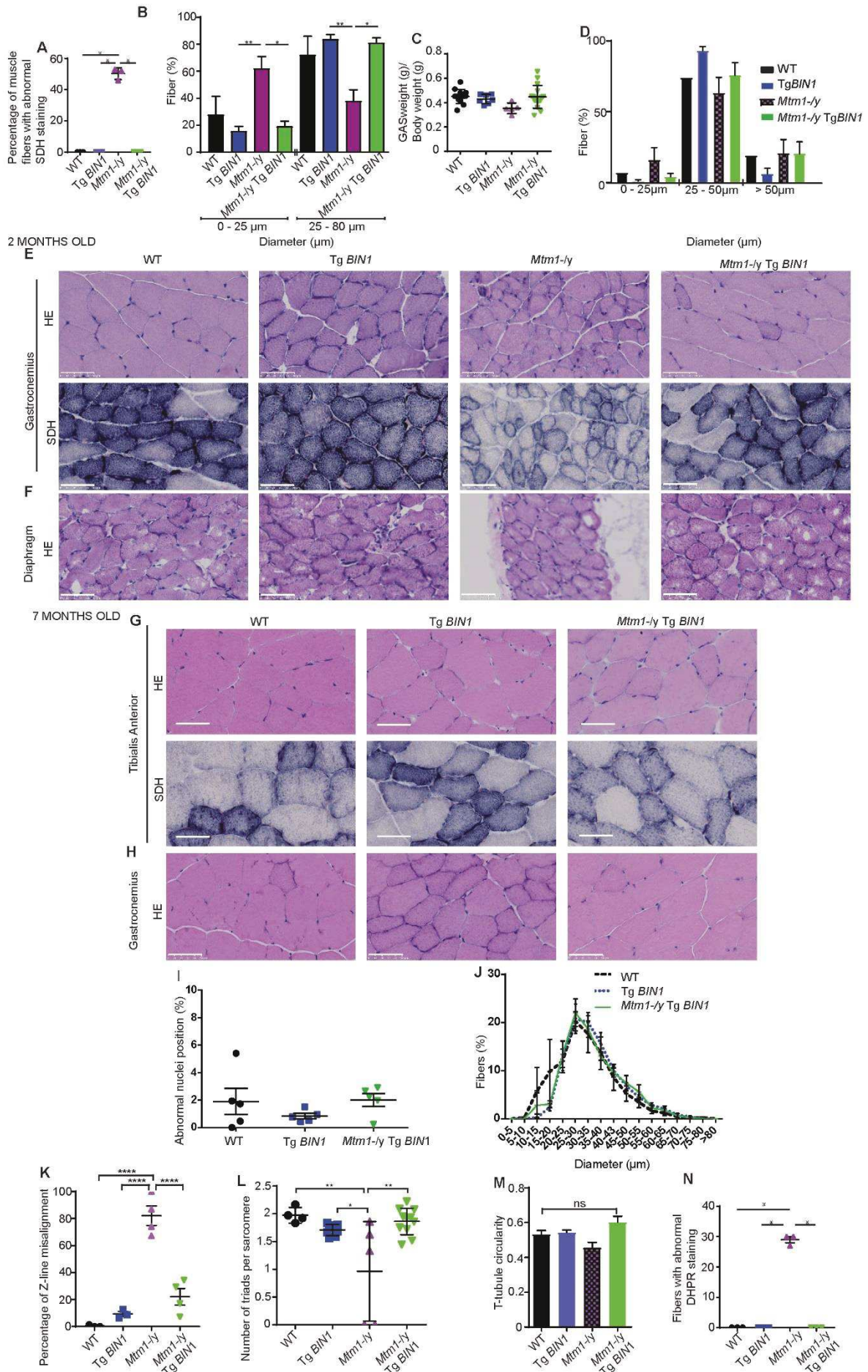
Movie S3 (.mp4 format). Postnatal systemic injection of AAV-*BINI* rescued *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice phenotypes.



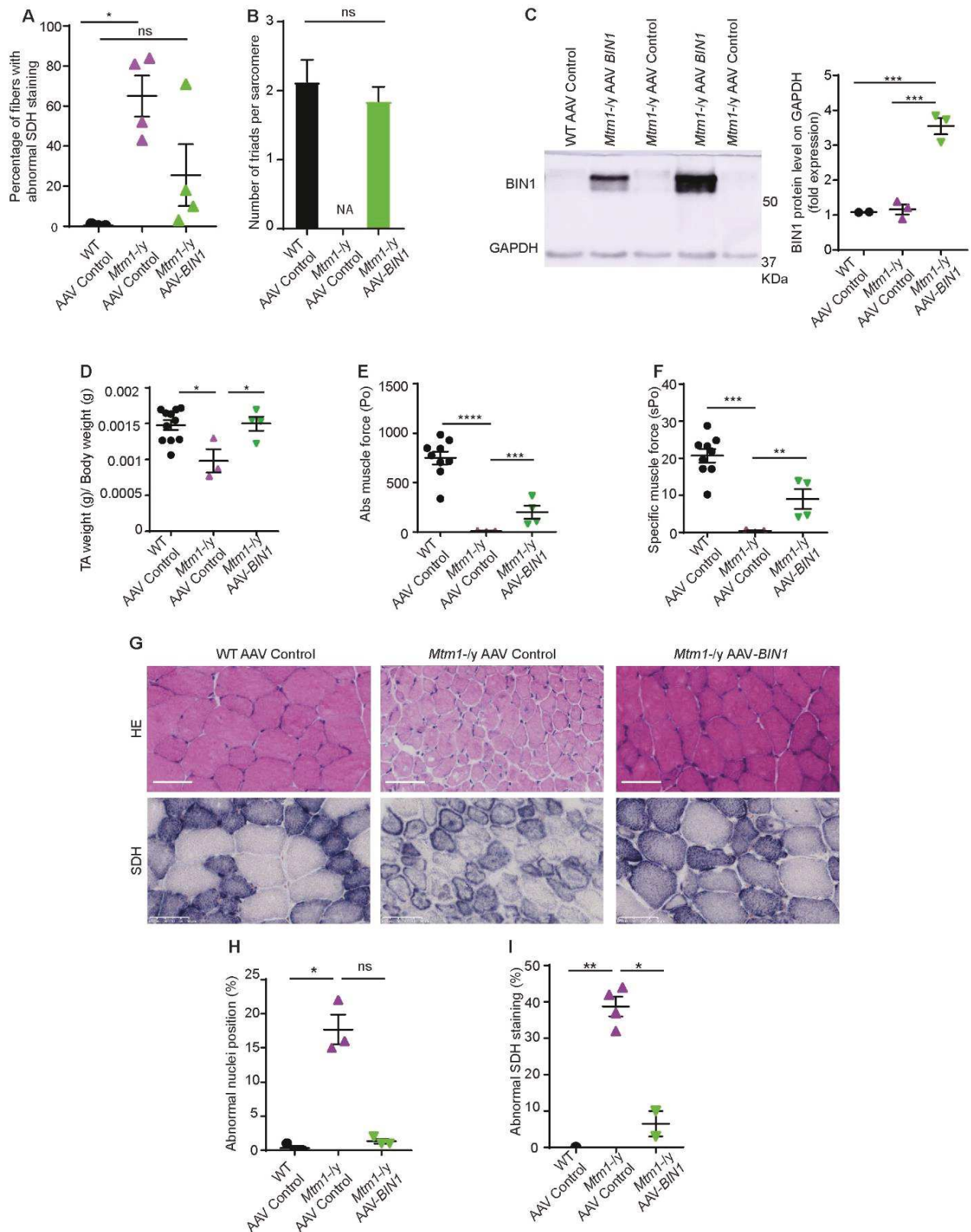
**Fig. S1. Creation of transgenic mice expressing human BIN1 (Tg*BIN1* mouse).** (A), Drawing of the bacterial artificial chromosome (BAC) encompassing the whole human *BIN1* locus. (B), Human *BIN1* isoform sequence expressed in tibialis anterior (TA) muscle, identified by cloning and sequencing RT-PCR products; chromatophorogram of *BIN1* exon 11 identified in *Mtm1*<sup>-/-</sup> Tg*BIN1* TA. *BIN1* isoform 8 is costited by N terminal BAR domain, PI domain, MBD domain and at the C terminal it has a SH3 domain. (C), Male body weight at 4 months (n=5). NA: not applicable as *Bin1*<sup>-/-</sup> mice died at birth. (D), Female body weight at 4 months (n=5). NA: not applicable as *Bin1*<sup>-/-</sup> mice died at birth. (E), Male Tibialis anterior weight at 4 months (n=5). NA: not applicable as *Bin1*<sup>-/-</sup> mice died at birth. (F), Female Tibialis anterior weight at 4 months (n=5). NA: not applicable as *Bin1*<sup>-/-</sup> mice died at birth. (G), Specific muscle force of the male TA at 4 months (n=5). NA: not applicable as *Bin1*<sup>-/-</sup> mice died at birth. (H), Specific muscle force of the female TA at 4 months (n=5). (I), Western blot from TA muscle extract from 3WT mice probed with anti *BIN1* and GAPDH antibodies. NA: not applicable as *Bin1*<sup>-/-</sup> mice died at birth. Statistical analysis: T-test; ns: not significant.



**Fig. S2. Increased BIN1 expression rescues the motor function and muscle force of *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice.** Note that *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice die by around 8w and are not available for comparison with *Mtm1*<sup>-/-</sup> TgBIN1 mice at late ages. (A), Body weight. (B), Grip test performed every month from 1 month to 12 months. The test was repeated 3 times for each mouse (n>7). (C), Bar test performed at 5w. *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice cannot walk on the bar. D and F, Rotarod tests performed at 5w (D), and 2 month old (F). (E) and (G), Footprint tests performed at 5w (E) and 2 months (G) (n≥5). (H), Absolute maximal force of the TA muscles (n≥3). (I), Time to fatigue for the TA muscles (n≥3). Statistical analysis: non parametric test Kruskal Wallis test and Dunn's post-hoc. ns: no significant difference, \*p < 0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



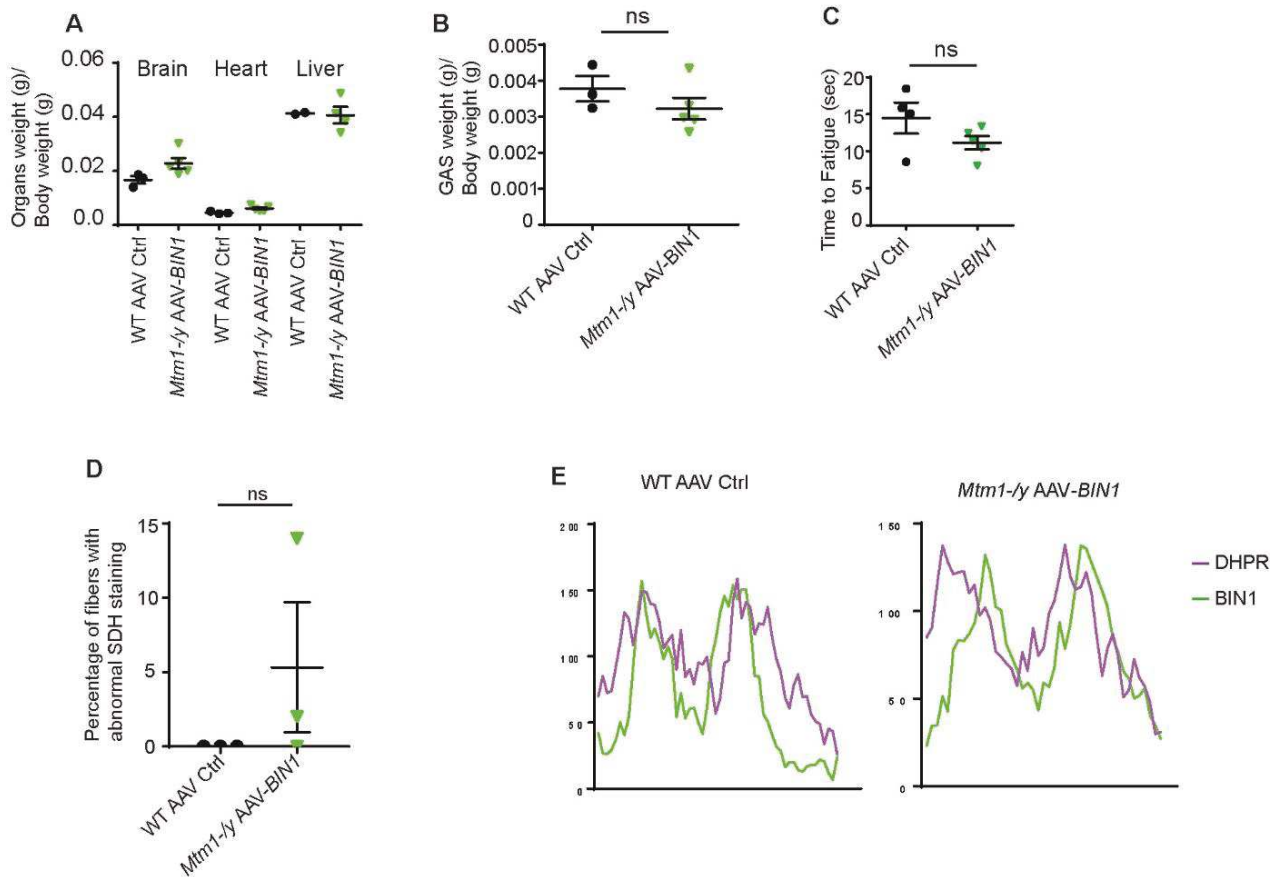
**Fig. S3. Increased BIN1 expression rescues muscle histology of *Mtm1*<sup>-/y</sup> mice at 2 and 7 months old.** Note that *Mtm1*<sup>-/y</sup> mice die by 8w and are not available for comparison with *Mtm1*<sup>-/y</sup> TgBIN1 mice at later ages. **(A)**, Percentage of fiber with abnormal SDH stain. **(B)**, Diameter of TA fibers grouped as small (0-25  $\mu\text{m}$ ) or large (25-80  $\mu\text{m}$ ) fibers at 2 months (n=5). SDH pictures are in Fig. 3A. **(C)**, Gastrocnemius weight normalized to total body weight at 2 month old (n $\geq$ 3). **(D)**, Diameter of Gastrocnemius fibers grouped as small (0-25  $\mu\text{m}$ ), medium (25-50  $\mu\text{m}$ ) and large (> 50 $\mu\text{m}$ ) fibers at 2 months. Animals analyzed: 1 WT, 2 Tg *BIN1*, 3 *Mtm1*<sup>-/y</sup> and 3 *Mtm1*<sup>-/y</sup> Tg *BIN1*. **(E)**, Transversal Gastrocnemius (GAS) muscle sections stained with HE and SDH at 2 month old. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . **(F)**, Transversal diaphragm muscle sections stained with HE at 2 month old. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . **(G)**, Transversal TA muscle sections stained with HE and SDH at 7 months old. **(H)**, Transversal GAS muscle sections stained with HE at 7 month old. **(I)**, Percentage of abnormal nuclei position (internal or central) in TA muscle at 7 month old (n=5). **(J)**, Fiber size diameter of TA muscle at 7 month old (n=5). **(K)**, Percentage of Z line misaligned observed in EM pictures (animals per genotype=3). **(L)**, Number of triads counted per sarcomere (animals per genotype=2). **(M)**, Circularity of the T-tubule in the triads (only 1 *Mtm1*<sup>-/y</sup> mouse was analyzed as triads were difficult to distinguish in other animals while n  $\geq$  2 for the other genotypes). Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . **(N)**, Percentage of muscle fibers with abnormal DHPR staining Statistical analysis: One-way ANOVA and Bonferroni test. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001.



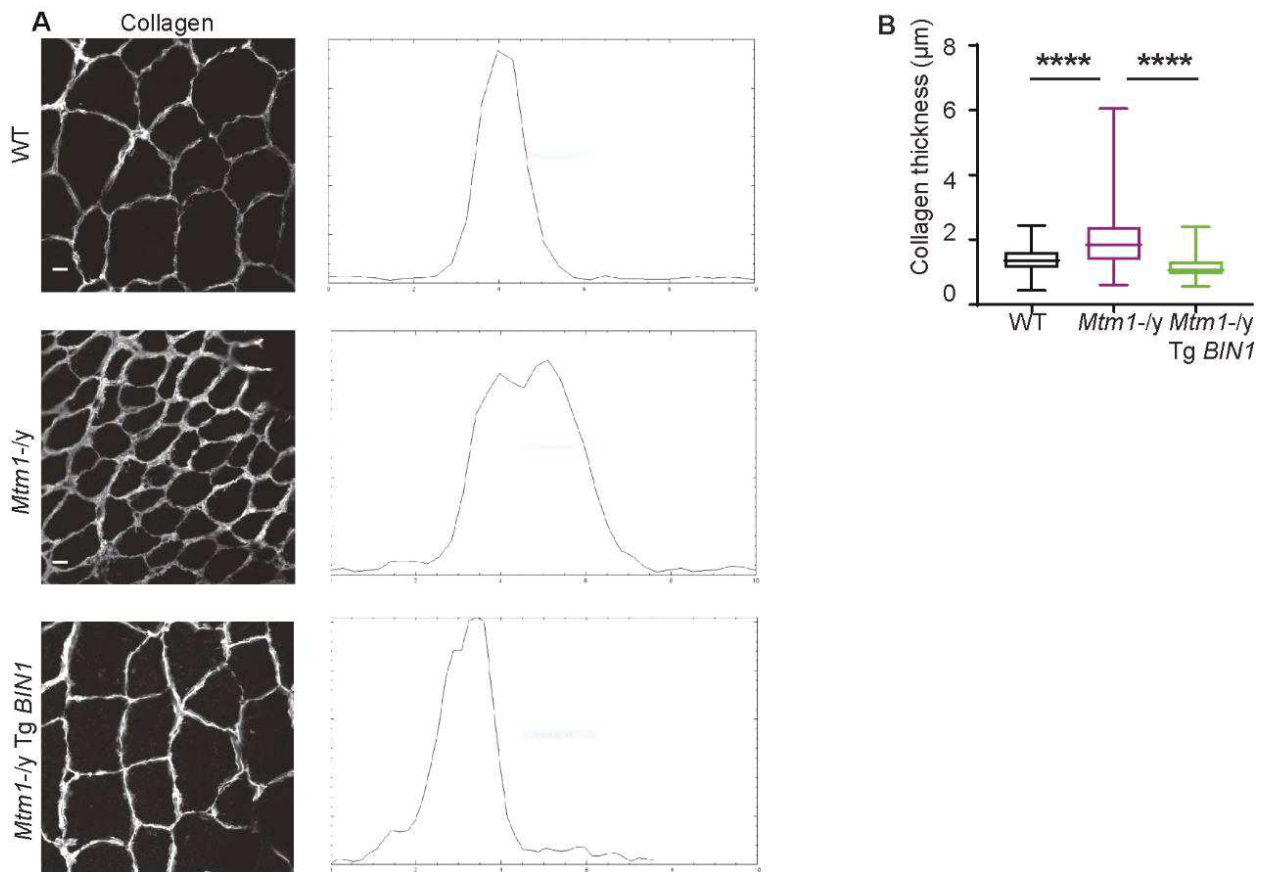
**Fig. S4. Postnatal intramuscular overexpression of BIN1 rescues muscle force and myofiber organization in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice.** *Mtm1*<sup>-/-</sup> were injected at 3 weeks with either AAV empty as control or AAV-BIN1, and mice were analyzed 2 to 4 weeks post-injection (n ≥ 3). (A), Percentage of fibers with abnormal SDH staining 2w post injection (n ≥ 2). The SDH staining pictures are in Fig. 4E. (B), Number of triads counted per sarcomere (animals per condition=1, triads counted ≥ 90). *Mtm1*<sup>-/-</sup>

muscle injected with AAV Ctrl was disorganized and triads difficult to be counted. (**C to H**): analysis at 4 weeks post-injection. (C), Western blot with anti-BIN1 antibody. BIN1 level was normalized on GAPDH. (D), TA muscle weight normalized on total body weight ( $n \geq 3$ ). (E), Absolute TA muscle force. (F), Specific TA muscle force ( $n \geq 3$ ). (G), Transversal TA sections stained with HE and SDH. (H), Percentage of fiber with abnormal nuclei position. (I), Percentage of fiber with abnormal SDH staining. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . Statistic test: One-Way ANOVA and Bonferroni test; ns: not significant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

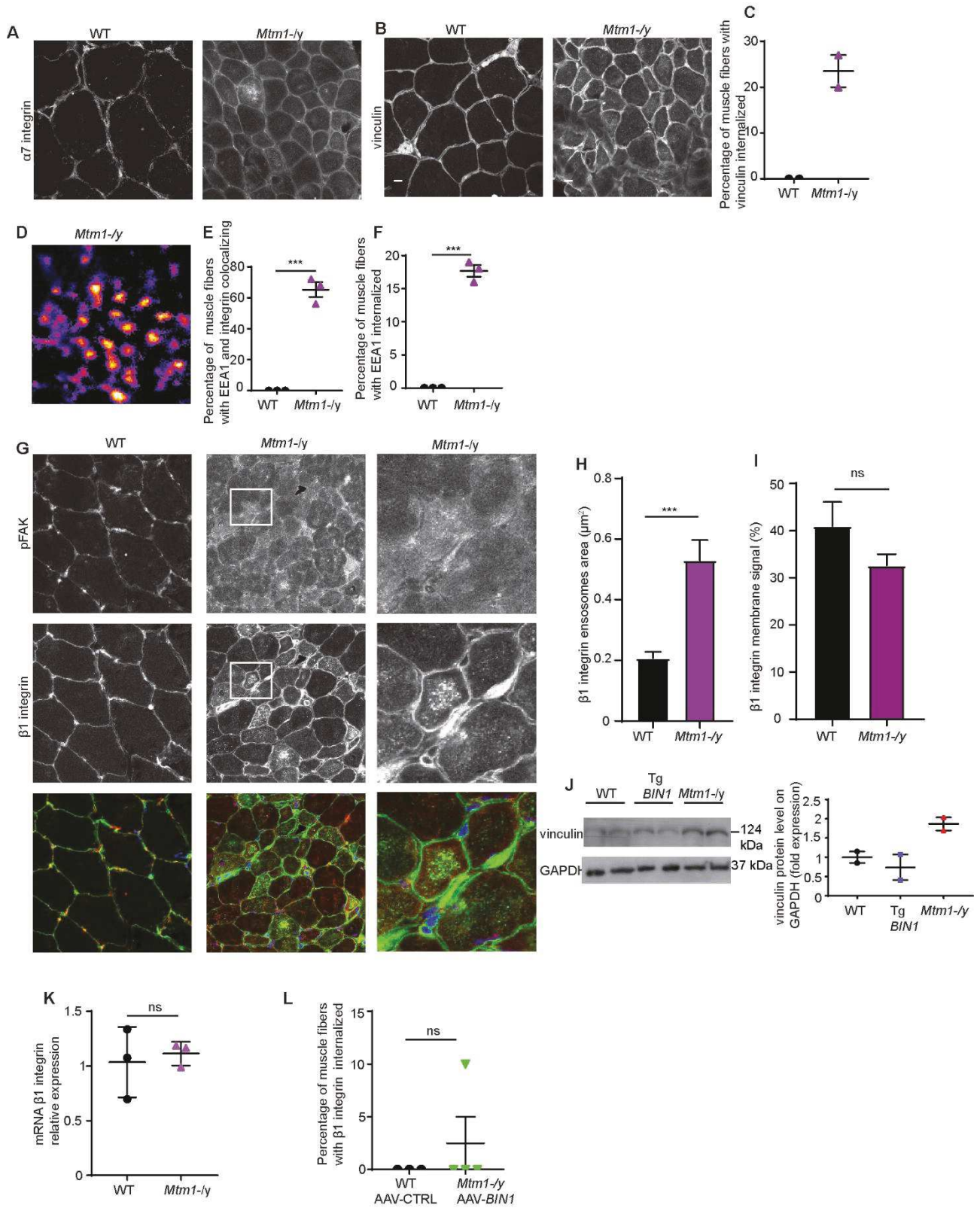




**Fig. S5. Organ weights and muscle fatigue in the *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice expressing BIN1 after systemic AAV delivery.** Mice were analyzed at 10w old (n≥2). *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice do not survive until 10w age. (A), Brain, heart and liver weights on total body weight (n≥2). (B), Gastrocnemius weight on total body weight (n≥3). (C), Time to fatigue for the TA muscle. (D), Percentage of fibers with abnormal SDH staining. The SDH pictures are in Fig. 5G. (E), Intensity plot showing the colocalization of BIN1 and DHPH signal in immunofluorescence pictures. Statistic test: Unpaired T-test, Mann-Whitney test : ns = no significant difference.



**Fig. S6. Extracellular matrix defects in *Mtm1*<sup>-ly</sup> muscle.** (A), Transversal TA stained with Collagen (Scale bar 10µm) and intensity plot showing collagen stained area profile. (B), Quantification of extracellular collagen thickness (fiber counted for WT and *Mtm1*<sup>-ly</sup>=140, *Mtm1*<sup>-ly</sup> Tg*BIN1*=50). (C), Drawing of the main costamere constituents. Statistical test, no-parametric test Kruskal Wallis test; ns: \*\*\*\* p<0.0001



**Fig. S7. Focal adhesion defects in *Mtm1*<sup>-/y</sup> myofibers.** (A), Transversal TA muscle sections stained for  $\alpha 7$  integrin. Scale bar, 10 $\mu$ m. (B), Transversal TA muscle sections stained for vinculin. (C), Percentage of fibers with vinculin internalized (n=2). (D), Transversal TA muscle section mask of EEA1 and  $\beta 1$  integrin, merge of Fig. 6M. (E), Percentage of abnormal  $\beta 1$  integrin stained muscle fibers with EEA1 and  $\beta 1$  integrin colocalization. (F), Percentage of fibers with abnormal enlarged endosomes EEA1 staining (n=3), (G), Transversal TA muscle sections staining for pY937 FAK (Tyr397) (Red) and  $\beta 1$  integrin (Green). (H), Area of endosomes stained with  $\beta 1$  integrin in primary myoblast (n=2, endosomes counted  $\geq 100$ ). (I), Percentage of  $\beta 1$  integrin plasma membrane signal in WT and *Mtm1*<sup>-/y</sup> primary myoblasts. (J), Western blot probed for vinculin and quantification of vinculin normalized to the GAPDH of the same gel. (K), mRNA expression level of  $\beta 1$  integrin (*Itgb1*) relative to Rpl27 housekeeping gene. (L), Percentage of fibers with abnormal  $\beta 1$  integrin aggregates inside the muscle fibers of WT injected with AAV-Ctrl and *Mtm1*<sup>-/y</sup> injected with AAV-BIN1 systemically (n $\geq 3$ ). Unpaired T-test, Mann-Whitney test : ns = no significant difference, \*\*\* p<0.001.

**Table S1. Breeding strategy and outcome for *Mtm1*<sup>-/+</sup>  $\times$  *Bin1*<sup>-/+</sup> with expected mice and obtained at E18.5 and 10 days after birth.**

Offspring	<i>Mtm1</i> -/+ $\times$ <i>Bin1</i> -/+			
	WT	<i>Bin1</i> -/+	<i>Mtm1</i> <sup>-/y</sup>	<i>Mtm1</i> <sup>-/y</sup> <i>Bin1</i> -/+
Expected genotypes	12%	12.5%	12.5%	12.5%
Obtained at E18.5	13.30%	13.30%	15%	8.30%
Obtained at PN 10 days	20%	19%	13%	0%

**Table S2. Breeding strategy and outcome for *Bin1*<sup>-/+</sup>  $\times$  *Bin1*<sup>-/+</sup> TgBIN1 with expected mice and obtained at E18.5 and 10 days after birth.**

Offspring	<i>Bin1</i> -/+ $\times$ <i>Bin1</i> -/+ Tg BIN1			
	WT	<i>Bin1</i> -/+	<i>Bin1</i> -/-	<i>Bin1</i> -/+ Tg BIN1
Expected genotypes	25%	25%	25%	25%
Obtained at PN 10 days	45%	23%	0%	32%

**Table S3. Raw data (Excel file).**

## Supplementary Movies

**Movie S1. Expression of human *BIN1* did not generate any obvious clinical phenotypes in mice.** Tg*BIN1* mice at 8 weeks.

**Movie S2. Increased *BIN1* expression rescues *Mtm1*<sup>-y</sup> phenotype.** WT mouse (left), *Mtm1*<sup>-y</sup> Tg*BIN1* mouse (center) and *Mtm1*<sup>-y</sup> mouse (right cage) of six weeks old. Tg*BIN1* mouse (left), WT mouse (center) and *Mtm1*<sup>-y</sup> Tg*BIN1* mouse (right) of seven months old. *Mtm1*<sup>-y</sup> Tg*BIN1* mouse of twelve months old performing hanging test.

**Movie S3. Postnatal systemic injection of AAV-*BIN1* rescued *Mtm1*<sup>-y</sup> mice phenotypes.** A 5w old *Mtm1*<sup>-y</sup> mouse injected with AAV empty control was affected with kyphosis and had difficulties to move in the cage while 5w old *Mtm1*<sup>-y</sup> mice injected with AAV-*BIN1* did not display any particular phenotypes. The postnatal overexpression of *BIN1* rescued *Mtm1*<sup>-y</sup> life span. One year old *Mtm1*<sup>-y</sup> injected with AAV-*BIN1* and WT injected with AAV Ctrl.

## **Partie 2**

### **Publication 2: « Defects of the TIAM-RAC1-actin pathway are a primary cause of myotubular myopathy »**

#### **Contexte de l'étude**

La myopathie myotubulaire est causée par des mutations du gène *MTM1*. Chez les patients atteints de la XLCNM tout comme dans les modèles animaux de la maladie, les biopsies musculaires sont caractérisées par des fibres de forme ronde avec une taille très réduite, un élargissement de l'espace entre les fibres musculaires et une localisation anormalement centrale des noyaux des fibres musculaires (Jungbluth et al., 2008; Romero, 2010). Ces anomalies de la taille, de la forme et de l'organisation des fibres musculaires sont révélatrices de défauts de régulation du cytosquelette et des adhésions focales.

Récemment, quelques études ont mis en évidence le rôle de MTM1 dans la régulation du recyclage des intégrines, qui sont les composants majeurs des adhésions focales (Ketel et al., 2016; Ribeiro et al., 2011). Par ailleurs, comme je l'ai décrit dans la partie 1 de mes résultats, les souris *Mtm1*<sup>-/-</sup> présentent des anomalies d'expression protéique et de localisation de l'intégrine  $\beta 1$  dans les fibres musculaires. Ces données suggèrent une désorganisation des adhésions focales qui pourrait résulter d'une perte de la régulation du cytosquelette d'actine et qui serait à l'origine des différents phénotypes histologiques et moteurs associés à la myopathie myotubulaire. Cependant, un tel mécanisme physiopathologique n'est à ce jour pas décrit dans les XLCNMs.

#### **Objectifs de l'étude**

Le principal objectif de cette étude était d'identifier les voies moléculaires et cellulaires qui sont dérégulées dans la myopathie myotubulaire et qui sont à l'origine des phénotypes moteurs et histologiques, essentiellement les défauts de la taille et de la forme des fibres musculaires, l'élargissement de la matrice extracellulaire séparant les fibres musculaires et la centralisation des noyaux.

#### **Résultats**

✓ L'analyse non biaisée de résultats de double hybride obtenus par notre équipe a mis en évidence une interaction entre MTM1 et la protéine TIAM2, connue pour son rôle dans l'échange de GDP en GTP de la GTPase RAC1. Les analyses de transcriptomique, confirmées par RT-qPCR et par western blot ont montré une dérégulation de l'expression de TIAM1 et TIAM2 dans les souris *Mtm1<sup>-/y</sup>* et ce, à l'âge de 2 semaines, phase pré-symptomatique, et à 7 semaines quand la maladie devient très sévère. J'ai ensuite analysé la voie TIAM-RAC, dont la fonction principale est de réguler le cytosquelette d'actine. L'activité de RAC1 était significativement diminuée dans les muscles des souris *Mtm1<sup>-/y</sup>*, accompagnée d'une diminution de la polymérisation de l'actine à la fois dans les muscles et dans les myoblastes primaires de souris *Mtm1<sup>-/y</sup>*, suggérant la dérégulation de la voie TIAM-RAC1 comme cause primaire de la maladie.

✓ La mécanotransduction, dépendante de la dynamique de l'actine et des adhésions focales est médiée, entre autres, par les co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ qui se relocalisent entre le cytoplasme et le noyau en fonction de leur état de phosphorylation (voir introduction). Dans cette étude, j'ai mis en évidence une dérégulation généralisée de la voie YAP/TAZ, notamment dans le muscle adulte avec une augmentation de la rétention de YAP dans le cytoplasme et une dérégulation de l'expression des gènes cibles. Par ailleurs, la localisation nucléaire de YAP et TAZ est diminuée dans les myoblastes primaires de souris *Mtm1<sup>-/y</sup>*.

✓ Notre étude a permis de montrer des défauts cellulaires inhérents à la dérégulation de l'actine et de la mécanotransduction. J'ai notamment mis en évidence des défauts des adhésions focales, notamment une augmentation de l'expression de paxilline, une protéine des adhésions focales, dans les muscles de souris *Mtm1<sup>-/y</sup>*. De plus, j'ai pu montrer des défauts de localisation des noyaux, qui forment des agrégats en forme de « sacs de noyaux » le long des myotubes primaires de souris *Mtm1<sup>-/y</sup>* en différenciation.

✓ Nous avons montré que l'inhibition directe de *Tiam1* par shRNA et l'inactivation de RAC1 dans les cellules reproduisent des phénotypes cellulaires similaires à ceux observés dans les myoblastes de souris *Mtm1<sup>-/y</sup>*, avec notamment une altération des

adhésions focales et de la dynamique de l'actine, et des défauts dans l'adhésion et la migration cellulaire. Par ailleurs, la suppression de *Tiam1 in vivo*, dans les souris *Tiam1<sup>-/-</sup>*, entraîne des défauts moteurs et certaines caractéristiques histologiques associées à la XLCNM.

✓ Afin de vérifier l'hypothèse que l'altération de l'expression de TIAM1 dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>* soit la cause et non la conséquence de la maladie, j'ai généré des souris double transgéniques *Mtm1<sup>-y</sup> Tiam1<sup>+/-</sup>* and *Mtm1<sup>-y</sup> Tiam1<sup>-/-</sup>*. On a pu voir que l'inhibition de l'expression de *Tiam1* réduit la survie des souris et aggrave les phénotypes moteurs et histologiques, avec un effet dose-dépendant. Si la réduction de l'expression de TIAM1 observée dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>* résultait d'un mécanisme compensatoire, nous aurions observé une amélioration du phénotype de la maladie en réduisant d'avantage son expression. Au lieu de cela, nous aggravons les phénotypes moteurs et histologiques des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*, de façon proportionnelle au niveau d'inhibition de TIAM dans ces souris. Cela suggère donc que les défauts d'expression de TIAM1 et l'altération de la voie RAC1-actine que cette protéine régule soient une cause primaire de la maladie.

## Conclusion

Les résultats de notre étude suggèrent que la dérégulation de la voie TIAM-RAC1-actine est à l'origine des principales caractéristiques et des défauts histologiques et moteurs associés à la myopathie myotubulaire et cette voie pourrait représenter un potentiel mécanisme pathologique commun aux différentes formes de myopathies centronucléaires.

## Contribution

Dans cette étude, j'ai effectué l'ensemble des tests biochimiques, de biologie moléculaire sur les souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. J'ai également isolé les myoblastes primaires à partir des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*, réalisé les tests d'immunomarquage, la microscopie et la caractérisation des différentes cellules (primaires et C2C12 transfectées avec les sh*Tiam1* ou traitées avec l'inhibiteur de RAC1). De plus, j'ai généré les souris *Mtm1<sup>-y</sup> Tiam1<sup>+/-</sup>* et *Mtm1<sup>-y</sup> Tiam1<sup>-/-</sup>*, pour lesquelles j'ai réalisé des tests de phénotypage et les analyses histologiques (Fig 1-7, Fig S1-S4).



Sarah Djeddi a analysé les données de transcriptomique (RNAseq). Marion Ciancia et Charlotte Gineste ont participé au phénotypage des souris *Tiam1*<sup>-/-</sup>, *Mtm1*<sup>-/y</sup> *Tiam1*<sup>+/-</sup> et *Mtm1*<sup>-/y</sup> *Tiam1*<sup>-/-</sup>, Christine Kretz a participé au génotypage des souris, Alexia Menuet a réalisé les tests de RT-qPCR de *Tiam1* et *Tiam2* dans les muscles des souris *Mtm1*<sup>-/y</sup>, Marie-Christine Birling, Marie Wattenhofer-Donze et Yann Herault ont généré la lignée de souris *Tiam1*<sup>-/-</sup> dans le cadre du projet phénomin (ICS) et Fabrice Riet a réalisé les tests et les analyses phénotypiques des souris *Tiam1*<sup>-/-</sup>.

Ce projet a été supervisé par Jocelyn Laporte.

## **Defects of the TIAM-RAC1-actin pathway are a primary cause of myotubular myopathy**

Sarah Djerroud<sup>1</sup>, Sarah Djeddi<sup>1</sup>, Marion Ciancia<sup>1</sup>, Charlotte Gineste<sup>1</sup>, Christine Kretz<sup>1</sup>, Alexia Menuet<sup>1</sup>, Fabrice Riet<sup>2</sup>, Marie-Christine Birling<sup>2</sup>, Marie Wattenhofer-Donze<sup>2</sup>, Yann Herault<sup>2</sup>, Jocelyn Laporte<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Inserm U1258, Cnrs UMR7104, Université de Strasbourg, F-67404 Illkirch, France

<sup>2</sup>Institut Clinique de la Souris, PHENOMIN-ICS, F-67404 Illkirch, France

\*Correspondance to J Laporte: IGBMC, 1 rue Laurent Fries, BP10142, 67404 Illkirch, France; [jocelyn@igbmc.fr](mailto:jocelyn@igbmc.fr); +33(3)88653412

## Abstract

Centronuclear myopathies (CNM) are severe diseases associated to muscle weakness and a general disorganization of myofibers with altered nuclei positioning. Myotubular myopathy (XLCNM or XLMTM) is the most common form, due to mutations in *MTM1* encoding myotubularin, and its pathomechanism is still poorly defined. Here, we investigated the molecular and cellular mechanisms causing myotubular myopathy in cell and animal models. The levels of the RAC1 Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) TIAM1 and RAC1 activity were reduced in muscles from the *Mtm1*<sup>-y</sup> knock-out mouse, a faithful model of XLCNM. The G/F actin ratio is increased and perinuclear actin cables are decreased. Additional defects in focal adhesion, cell adhesion and migration, and in the nuclear translocation of the YAP/TAZ complex were found in *Mtm1*<sup>-y</sup> primary myoblasts, supporting a general alteration in mechanotransduction. *Mtm1*<sup>-y</sup> cellular phenotypes were recapitulated upon reduction of TIAM1 level or RAC1 activity, and *Tiam1* knock-out in mice displayed XLCNM-like motor defects and aggravated *Mtm1*<sup>-y</sup> motor and histological phenotypes. In conclusion, we reveal defects of the TIAM-RAC1-actin pathway as a primary cause of the main hallmarks of myotubular myopathy, and TIAM1 as a modifier of this disease. Alteration in this pathway may represent a common pathomechanism in different centronuclear myopathies.

**Keywords:** RAC1, GTPase, centronuclear myopathy, congenital myopathy, actin, TIAM

## Introduction

Centronuclear myopathies (CNM) are severe muscle diseases associated to muscle weakness and hypotonia, and are characterized by a general disorganization of myofibers with centralization of nuclei, the histopathological sign at the origin of the diseases' name (Jungbluth et al., 2008; Romero, 2010). CNM affect newborns, children or/and adults, and the most severe forms have a strong impact on quality of life and lifespan mainly due to prominent respiratory defects. Different CNM forms have been characterized (Tasfaout et al., 2018). The most common and severe is X-linked CNM (XLCNM ; MIM#310400; also called myotubular myopathy) due to mutations in the *MTM1* gene encoding the 3-phosphatase myotubularin that dephosphorylates phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> into PtdIns and PtdIns5P (Blondeau et al., 2000; Laporte et al., 1996; Taylor et al., 2000). Other main mutated genes are *BINI* coding for the membrane remodeling protein amphiphysin 2, *DNM2* coding for the large GTPase dynamin regulating membrane tubulation and fission, and *RYR1* coding for a calcium channel located at muscle triads and implicated in excitation-contraction coupling (Jungbluth et al., 2018; Schartner et al., 2019). A main bottleneck in the understanding of myotubular myopathy and the development of therapies is the poorly defined cellular pathomechanism that we have investigated here.

Skeletal muscle of patients with myotubular myopathy displays small rounded fibers with increased interfiber space, correlating with a major intracellular disorganization of myofibers including sarcomere misalignment, mislocalization of nuclei and mitochondria, and structural alterations of the triads (Lawlor et al., 2016; Romero, 2010). These phenotypes were faithfully recapitulated in the *Mtm1*<sup>-y</sup> mouse that develops a progressive motor defects and histopathology from 2-3 weeks (w) of age leading to death by about 8 w (Al-Qusairi et al., 2009). This general intracellular disorganization is suggestive of cytoskeleton defects, albeit this pathway was barely investigated. However, other molecular and cellular defects were reported to potentially explain the muscle weakness and atrophy, and included alteration of calcium homeostasis (Al-Qusairi et al., 2009; Dowling et al., 2009; Kutchukian et al., 2019), mitochondria dynamics (Hnia et al., 2011), desmin stability (Hnia et al., 2011), autophagy and ubiquitin-proteasome pathways (Fetalvero et al., 2013; Gavriilidis et al., 2018), and neuromuscular junction integrity (Dowling et al., 2012; Robb et al., 2011). Recently, a couple of studies implicated myotubularin and ortholog in integrin trafficking (Ketel et al., 2016; Lionello et al., 2019; Ribeiro et al., 2011), suggestive of defects in focal adhesion that may be linked to the regulation of actin cytoskeleton.

Actin cytoskeleton is mainly regulated by small GTPase of the Rho family. They are molecular switches cycling between GTP-loaded active and GDP-loaded inactive states (Hodge and Ridley, 2016). GTPase activating proteins (GAP) promotes the GTP hydrolysis while the GTP exchange factors (GEF) favor GDP dissociation and GTP loading. For example, TIAM1 and TIAM2 are GEFs acting more specifically on RAC1 (Hoshino et al., 1999; Marei and Malliri, 2017). In skeletal muscle, RAC1-mediated actin remodeling is required for migration and fusion of myoblasts (Becky et al., 2020; Charrasse et al., 2007). N-WASP, an effector of RAC1, was implicated in triad organization and nuclear positioning in myofiber (Falcone et al., 2014). TIAM2 regulates nuclear positioning in non-muscle cells (Woroniuk et al., 2018) and Arp2/3, a RAC1 effector that nucleates actin filaments, controls nuclear positioning in myofiber (Roman et al., 2017).

Here, we aim to decipher the molecular and cellular mechanisms at the basis of the main phenotypes of myotubular myopathy. Through unbiased approaches as interactome and transcriptome, we identified dysregulation of TIAM1 in models of myotubular myopathy. Using *in vitro*, cell systems and *Mtm1* and *Tiam1* knock-out mice, we show that defects in the TIAM1-RAC1-actin pathway is responsible for a large part of the motor and histological hallmarks of myotubular myopathy.

## Results

### **Alteration of the TIAM-RAC-actin pathway in the myotubular myopathy mouse model**

To identify the molecular and cellular pathological mechanism implicated in myotubular myopathy, unbiased omics approaches as interactome and transcriptome were used. A yeast two-hybrid screen was performed with human MTM1 truncated from its N-terminal GRAM-PH domain as a bait against a human fetal and adult skeletal muscle library and identified part of TIAM2 coding for the Dbl homology (DH) domain that is known to mediate the GDP to GTP exchange of RAC1 (Fig 1A). In addition, the transcriptome of the *Mtm1*<sup>-/-</sup> mouse model of myotubular myopathy compared to WT littermates was characterized by RNAseq from tibialis anterior (TA) muscle at 2 w (early disease state) and 7 w (strongly affected). Both *Tiam1* and

*Tiam2* were found significantly dysregulated at early and late disease states, with *Tiam1* decreased (0.9 fold at 2w and 0.7 fold at 7w) and *Tiam2* increased (1.4 fold at 2 w and 1.5 fold at 7 w) (Fig 1B-C). These findings were confirmed by RT-qPCR at 2 and 7 w (Fig 1D-E) and by western blotting at 7 w (Fig 1 F-I). We previously showed that downregulation of *Dnm2* through transgenesis or antisense oligonucleotides prevent and revert the different phenotypes of the *Mtm1*<sup>-y</sup> mouse (Cowling et al., 2014; Tasfaout et al., 2017). *Tiam1* and *Tiam2* dysregulations were rescued in *Mtm1*<sup>-y</sup>*Dnm2*<sup>+/-</sup> mice at both early and late disease states (Fig 1B-E). Importantly, both dysregulations of *Tiam1* and *Tiam2* in *Mtm1*<sup>-y</sup> mice are detected at 2 w, when there is barely any phenotypes, and their normalization upon phenotypic rescue suggest defect of the TIAM pathway is a primary cause of myotubular myopathy.

We thus further investigated the TIAM-RAC1 pathway, which main function is to regulate the actin cytoskeleton, in primary muscle cells and TA muscle from the *Mtm1*<sup>-y</sup> mouse. *Rac1* expression was unchanged at the RNA level in RNAseq and RT-qPCR experiments; however RAC1 protein level was significantly increased by 1.5 fold in TA muscles at 7 w (Fig 2A-C). Conversely, the amount of RAC1 bound to GTP was decreased by 0.5 fold (Fig 2D). These data indicate TIAM dysregulations correlate with RAC1 defects. RAC1 regulates actin dynamics through the parallel control of the actin polymerization complex Arp2/3 and of the actin severing protein cofilin (Arber et al., 1998; Ten Klooster et al., 2006; Yang et al., 1998). Although total cofilin protein level was normal (Fig S1 A-B), the fraction of phospho-cofilin (Ser-3) is increased in TA from *Mtm1*<sup>-y</sup> mice compared to WT mice (Fig 2E-F), and the RNA level of *Ssh1*, coding for the Slingshot 1 (SSH1), cofilin-specific phosphatase, is decreased (Fig S1 C). RAC1 activation prevents actin severing by an inhibitory phosphorylation of cofilin (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998). *Actr3b* and its gene product ACTR3B (also called ARP3) were significantly decreased at the RNA and protein levels in *Mtm1*<sup>-y</sup> muscle at 7 w (Fig 2G-I). Defects of RAC1 activation and Arp2/3 complex prompted to investigate actin dynamics. The ratio of globular to filamentous actin (G/F ratio) was increased in *Mtm1*<sup>-y</sup> muscle (Fig 2J). This data correlated with a significant decrease in the number of actin cables and an increase in actin aggregation in primary myoblasts from the *Mtm1*<sup>-y</sup> mouse (Fig 2K-M).

Overall, through unbiased approaches and specific molecular and cellular investigations of the mouse model for myotubular myopathy, we found a consistent defect in the TIAM-RAC1 pathway

leading to alteration of actin cytoskeleton. These defects appear as a primary disease cause as they were found both in cultured cells and muscles.

### **The YAP/TAZ pathway is altered in the myotubular myopathy mouse model**

Actin organization and dynamics is important to sense and adapt to mechanical stress. Mechanotransduction is then mediated at least in part by the transcriptional co-activators YAP and TAZ that translocate from the cytoplasm to the nucleus when not phosphorylated (Totaro et al., 2019). YAP/TAZ levels, subcellular localization and phosphorylation were thus investigated in myoblasts and muscles from the *Mtm1<sup>-y</sup>* mouse. While *Taz* RNA level was significantly decreased in TA muscles, there was no difference in the level of YAP and TAZ proteins (Fig 3A-F). Subcellular localization of YAP and TAZ was then assessed in primary myoblasts from the *Mtm1<sup>-y</sup>* mouse differentiated in culture into multi-nucleated myotubes. The nuclear to cytoplasm ratio of YAP and TAZ were decreased in *Mtm1<sup>-y</sup>* muscle cells before and after 3 days (d) of differentiation (Fig 3G-L; Fig S2A-B). In addition, the decrease of nuclear YAP correlated with the increase in phospho-YAP (S-127) fraction in *Mtm1<sup>-y</sup>* TA muscle (Fig 3M-N; Fig S2C-D). YAP and TAZ bind notably to TEAD4, a transcription factor highly expressed in skeletal muscle and required for primary myoblast differentiation *in vitro* and muscle regeneration *in vivo* (Joshi et al., 2017), and regulate the expression of several target genes, among which: *Cryr61*, *MyoG*, *Myf9*, *Pax7* and *Amotl2*. The RNA levels of *Tead4* and *Cryr61* and *MyoG* were significantly increased while *Myf9*, *Pax7* and *Amotl2* were decreased in *Mtm1<sup>-y</sup>* muscle (Fig 3O-P; Fig S2E-J). In conclusion, these data support a general dysregulation of the YAP/TAZ mechanotransduction pathway correlating with the actin defects in the model of myotubular myopathy.

### **Defects in focal adhesion and abnormal accumulation of nuclei in the *Mtm1<sup>-y</sup>* muscle cells**

Defects in the actin and YAP/TAZ pathways suggest a potential alteration in focal adhesion. Indeed, the actin cytoskeleton links focal adhesion with mechanotransduction (Dasgupta and McCollum, 2019). Moreover, a hallmark of myotubular myopathy histology is increased interfiber space; it was recently shown that MTM1 is involved in beta integrin recycling and *Mtm1<sup>-y</sup>* muscles exhibited an increase in intracellular beta1 integrin. Thus, we investigated the level of paxillin, a

main component of focal adhesion, in muscle. Paxillin (*Pxn*) RNA level was unchanged while there was an increase of 2-fold at the protein level (Fig 4A-C). These data suggest defects in the focal adhesions. TIAM regulates nuclear orientation in adherent fibroblast (Woroniuk et al., 2018), and Arp proteins control the movement of nuclei from the center to the periphery of myofibers differentiated in culture (Roman et al., 2017). Noteworthy, centralization of nuclei in myofibers is a main hallmark of myotubular myopathy (Romero, 2010). Nuclei positioning was characterized in *Mtm1*<sup>-/y</sup> muscle cells differentiated in culture. Strikingly, *Mtm1*<sup>-/y</sup> myotubes exhibited nuclei aggregation, resembling ‘bags of nuclei’ (Fig 4D-E). The distance between the nearest nuclei was also decreased after 1, 3 and 5 d of differentiation (Fig 4F-H), confirming a primary defect in nuclear positioning in myotubular myopathy.

### **Inhibition of TIAM1 or RAC1 in muscle cells results in myotubular myopathy-like phenotypes**

The previous data showed a consistent alteration in the TIAM-RAC1-actin pathway correlating with cellular defects reminiscent of myotubular myopathy. We thus asked whether TIAM1 decrease or RAC1 inactivation, observed above in *Mtm1*<sup>-/y</sup> muscles, mimic the myotubular myopathy phenotypes, first in cultured cells. C2C12 murine muscle cells were grown on laminin-coated plates and transfected with a construct expressing a *Tiam1* shRNA or a scramble sequence and labelled with phalloidin and paxillin to identify actin and focal adhesion respectively (Fig 5A-C, Fig S3A-B). A general disorganization of actin was noted, with a strong reduction in the number of actin cables over nuclear area (Fig 5D). The number of focal adhesion was decreased upon *Tiam1* knockdown (Fig 5E). Moreover, while actin cables connected focal adhesions in untransfected or scramble transfected cells, this connection was lost upon *Tiam1* knockdown (Fig 5C). In addition, the cell surface was decreased after 1h adhesion in sh*Tiam1* cells compared to scramble-transfected cells (Fig 5F). Live imaging was performed in transfected C2C12 myoblasts grown on matrigel, and showed sh*Tiam1* cells displayed a decreased migration distance (Fig 5G). These data suggest that TIAM1 defect leads to actin disorganization which further impacts on focal adhesion integrity and function in adhesion and migration.

To assess if the above defects were due to the action of TIAM1 on RAC1, muscle cells were treated with NSC23766, which inhibits TIAM-RAC1 interaction (Gao et al., 2004). Following 4 h of treatment with 100  $\mu$ M NSC23766, the GTP-loaded RAC1 fraction was decreased to 36%



compared to untreated (Fig S3C). Similarly as in sh*Tiam1* cells, RAC1 inhibition resulted in reduction in the number of actin cables, decreased number of focal adhesion, reduction of the cell surface and of the migration distance (Fig 5H-N).

Taken together, these data showed that TIAM1 reduction observed in *Mtm1*<sup>-y</sup> cells is responsible for RAC1 inhibition which leads to actin disorganization and defects of focal adhesion function.

### **Lack of TIAM1 in mice recapitulates several myotubular myopathy phenotypes**

The above data obtained in cultured cells support that the TIAM1 reduction and RAC1 inhibition observed in muscle tissues from the *Mtm1*<sup>-y</sup> mouse are a primary cause of the cellular phenotypes of *Mtm1*<sup>-y</sup> cells. To define if TIAM1 reduction leads to a myotubular myopathy phenotype *in vivo*, homozygous knock-out *Tiam1* mice (*Tiam1*<sup>-/-</sup>) were analyzed for their motor function and histology. Both sexes were considered. *Tiam1*<sup>-/-</sup> females were the most affected compared to WT controls, with a decrease in body weight, in grip strength, and in latency to fall during an accelerating protocol on rotarod at 9 w (Fig 6A-C). In open-field at 8 w, they displayed a decreased distance travelled and reduction in average speed, but no defects in number of rears (Fig 6D-F). *Tiam1*<sup>-/-</sup> males appeared less affected and mainly showed a reduction in grip strength. These data support that lack of TIAM1 causes motor defects in mice. The mitochondria oxidative activity of TA muscles at 16 w with succinate dehydrogenase (SDH) staining showed no obvious defects in *Tiam1*<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice (Fig 6G). However, hematoxylin-eosin (HE) staining revealed a slight but significant decrease in fiber size, with more small fibers (<35µm) and less large fibers (>35µm) in *Tiam1*<sup>-/-</sup> mice compared to WT littermates (Fig 6G-I). A slight increase in internalized nuclei was also noted in *Tiam1*<sup>-/-</sup> mice (Fig 6J). In conclusion, lack of TIAM1 in muscle results in motor defects and a histopathology reminiscent of the *Mtm1*<sup>-y</sup> mouse and of patients with myotubular myopathy.

### ***Tiam1* is a modifier gene for myotubular myopathy in mice**

The findings that TIAM1 is decreased in the *Mtm1*<sup>-y</sup> mouse and that *Tiam1*<sup>-/-</sup> mice display several myotubular myopathy phenotypes supports that reduction of TIAM1 is a cause of the disease and not a compensatory mechanism. To confirm this hypothesis, we generated double transgenic animals, *Mtm1*<sup>-y</sup> *Tiam1*<sup>+/-</sup> and *Mtm1*<sup>-y</sup> *Tiam1*<sup>-/-</sup>. *Mtm1*<sup>-y</sup> mice have a strong decrease in lifespan, reduced body weight and motor function (Fig 7A-C) (Al-Qusairi et al., 2009). *Mtm1*<sup>-y</sup> *Tiam1*<sup>-/-</sup>

mice died sooner and weighted less than *Mtm1<sup>-y</sup>* mice, and *Mtm1<sup>-y</sup> Tiam1<sup>+/-</sup>* mice had a similar lifespan and body weight as *Mtm1<sup>-y</sup>* mice but appeared more affected upon inspection with hindlimbs weakness and less activity (S Movie1). *Mtm1<sup>-y</sup> Tiam1<sup>+/-</sup>* mice displayed a stronger reduction in the ability to hang upside-down from a grid compared to *Mtm1<sup>-y</sup>* mice at 5 and 6 w, while *Mtm1<sup>-y</sup> Tiam1<sup>-/-</sup>* mice could not be analyzed at 6 w due to their decreased survival.

*Mtm1<sup>-y</sup>* mice histopathological hallmarks are smaller myofibers with increased internalized/centralized nuclei, increased interfiber space and abnormal mitochondria oxidative activity, similarly to myotubular myopathy patients (Fig 7D-J). *Mtm1<sup>-y</sup> Tiam1<sup>+/-</sup>* mice displayed extremely small fibers compared to WT or even *Mtm1<sup>-y</sup>* mice in the TA muscle at 5 w, with 1.5 x more internalized nuclei. The mitochondria oxidative activity was even more affected in TA muscles of *Mtm1<sup>-y</sup> Tiam1<sup>+/-</sup>* than WT or even *Mtm1<sup>-y</sup>* mice.

Overall, reduction of TIAM1 in *Mtm1<sup>-y</sup>* mice aggravates its myotubular myopathy phenotypes including survival, motor function and histopathology, in a dose-dependent manner. These data confirm *in vivo* that TIAM1 defect is a main cause of myotubular myopathy, and suggest *TIAM1* is a modifier gene of the disease.

## Discussion

Here, we investigated the molecular and cellular mechanisms causing myotubular myopathy in cell and animal models. The RAC1 GEF TIAM1 was decreased at early stage of the disease *in vivo*, RAC1 activity reduced in affected muscles, and actin dynamics altered in muscle cells. Focal adhesions were affected and the YAP/TAZ/TEAD4 pathway mediating mechanotransduction downstream of actin and focal adhesion through transcriptional adaptation was altered. To assess if the decrease of TIAM1 and RAC1 activity were a primary cause of the disease, we inhibited them in cells and also characterized the motor function and muscles of *Tiam1* knock-out mice alone or in combination with *Mtm1* knock-out. *Tiam1* downregulation or RAC1 inactivation in muscle cells reproduced similar cellular defects as found in *Mtm1<sup>-y</sup>* cells, and *Tiam1<sup>-/-</sup>* mice displayed motor defects and histological hallmarks of myotubular myopathy. Moreover, *Tiam1* genetic reduction in *Mtm1<sup>-y</sup>* mice exacerbated their motor and muscle phenotypes. We conclude that defects in the TIAM-RAC1-actin pathway is a main cause of the typical intracellular

disorganization of myofibers in myotubular myopathy and that TIAM1 is a modifier of this phenotype.

### **Consistent defects of the TIAM-RAC1-actin pathway in myotubular myopathy**

TIAM1 is a GEF activating RAC1 that in turn controls actin dynamics via notably cofilin and Arp2/3. TIAM1 was also reported to directly interact with Arp2/3 to control actin polymerization (Ten Klooster et al., 2006). Consistent alterations were found here at different levels of this pathway in muscle and cells devoid of MTM1. The observed reduction of TIAM1 could explain the decreased fraction of GTP-loaded RAC1. In turn, RAC1 inactivation is consistent with the decrease of actin cables in *Mtm1*<sup>-y</sup> cells. It is feasible some defects observed reflect compensatory mechanisms. Noteworthy, defects of the TIAM-RAC1-actin pathway are most probably primary and thus disease causing, as alteration of TIAM levels were detected at 2 w during the pre-symptomatic phase in *Mtm1*<sup>-y</sup> mice and as several defects in this pathway were present in cultured myoblasts.

MTM1 is a 3-phosphoinositide phosphatase that was previously reported to be recruited to membrane ruffles upon RAC1 activation in transfected HeLa cells (Laporte et al., 2002), and the *C. elegans* ortholog *mtm-1* genetically interacts with the GEF complex regulating RAC1 for cytoskeleton rearrangement during apoptotic cell clearance (Neukomm et al., 2011). MTM1 or its phosphoinositides substrates (PtdIns3P and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) or product (PtdIns5P) may directly bind to TIAM proteins to regulate TIAM-mediated activation of RAC1. Preliminary data suggested MTM1 binds TIAM proteins at the DH domain which is the RAC1 binding domain. The DH or RhoGEF domain induces Rho family GTPases to displace GDP, allowing GTP binding as GTP is in excess over GDP in the cell. Published data reported that PtdIns3P or PtdIns5P can bind TIAM proteins. Membrane recruitment of TIAM1, and thus further activation of RAC1, indeed depends on different phosphoinositides (Fleming et al., 2004). Noteworthy, while PtdIns3P is not required for membrane recruitment, it binds to the C-terminal PH domain of TIAM1, adjacent to the DH domain, and is critical for its activation (Baumeister et al., 2003). Similarly, PtdIns5P binds to TIAM1 leading to RAC1 activation at membrane ruffles (Viaud et al., 2014). The cellular functions controlled by MTM1 and by the TIAM-RAC1-actin pathway appears similar. Indeed, lack of MTM1, downregulation of TIAM1 or inhibition of RAC1 in muscle cells

led to decreased focal adhesion number, and reduced cell adhesion and migration (Figs 4-5). These data are consistent with the report that myoblast migration is dependent on TIAM1 (Becky et al., 2020). Defects of cell adhesion and migration impact on myoblast differentiation. We reported that the fusion index of primary *Mtm1*<sup>-y</sup> myoblasts was decreased (Lionello et al., 2019). RAC1 is important for myoblast fusion as well, both in cultured cells and *in vivo* (Meriane et al., 2000; Vasyutina et al., 2009). MTM1 was required for YAP/TAZ nuclear translocation in myoblasts (Fig 3). It was shown that YAP and TAZ regulates myoblast proliferation and differentiation (Sun et al., 2017; Watt et al., 2010). The defects in focal adhesion in *Mtm1*<sup>-y</sup> muscle, and the defects observed in cell adhesion and migration, may originate either from a reduction in RAC1 activation and/or from a defect in integrin recycling defects. Indeed, RAC1 and integrins both participates in focal adhesion regulation and signaling (Berrier et al., 2002). In addition, MTM1 was implicated in beta1 integrin recycling in cultured cells (Ketel et al., 2016), and *Mtm1*<sup>-y</sup> mice muscles displayed intracellular accumulation of beta1 integrin and vinculin and alteration of the focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation (Lionello et al., 2019).

Overall, based on the present data and the literature, we propose MTM1 regulates TIAM1-dependent activation of RAC1 and the downstream pathways controlling actin dynamics, cell adhesion, intracellular organization and differentiation.

### **TIAM-RAC1 defects as a primary disease cause and a potential common pathomechanism in different centronuclear myopathies**

Primary defects in the TIAM-RAC1-actin pathway and cell adhesion are likely to cause the main hallmarks of myotubular myopathy *in vivo*. Alteration in cell adhesion correlates with the small and rounded myofibers with increased interfiber space (Lawlor et al., 2016; Romero, 2010). Potential defects in mechanotransduction, mediated by alteration of focal adhesion and of the YAP/TAZ localization and target genes expression, correlates with reduced force generation in *Mtm1*<sup>-y</sup> mice and patients with myotubular myopathy. It was recently proposed, in another form of centronuclear myopathy due to mutations in DNM2, that defects in the costamere structure rich in actin may explain the reduced force generation also observed in the *Dnm2*<sup>+R465W</sup> mouse (Franck et al., 2019). In addition, the same team reported alteration of the YAP/TAZ pathway in the same mouse model (Franck et al., 2018). Of note, dynamin 1 (DNM1) can directly bind to actin and DNM1 oligomer assembly promotes actin polymerization (Gu et al., 2010). Moreover, muscle

fibers isolated from the *Dnm2*<sup>+R465W</sup> mouse exhibited altered actin organization and reduced actin polymerization (González-Jamett et al., 2017).

In addition, *Mtm1*<sup>-y</sup> myotubes displayed abnormal nuclei accumulation, resembling ‘bag of nuclei’ (Fig 4), and centronuclear and myotubular myopathies are characterized by misplaced nuclei (Romero, 2010). It was shown that both microtubule and actin cytoskeletons regulate different phases of nuclei positioning in myofibres (Janota et al., 2020; Roman and Gomes, 2018; Roman et al., 2018). Arp2/3 and actin organize peripheral nuclear positioning in myofibers, potentially through the implication of intermediate filaments (Roman et al., 2017). Of note, TIAM2 was shown to stabilize the perinuclear actin cap regulating nuclear stiffness and mechanical induced gene expression (Woroniuk et al., 2018). BIN1, another protein mutated in centronuclear myopathy, was shown to regulate nuclear positioning, potentially through N-WASP and actin in myofibres (Falcone et al., 2014), or/and through direct binding to actin and to nesprin in *C. elegans* (D’Alessandro et al., 2015). Interestingly, overexpression of human BIN1 efficiently rescued the motor and histological defects of the *Mtm1*<sup>-y</sup> mouse (Lionello et al., 2019).

The present data showed that similar cellular defects are observed upon either MTM1 removal, TIAM1 downregulation or RAC1 inactivation (Figs 4-5). In addition, lack of TIAM1 in mouse led to motor defects concomitant to a slight decrease in myofibers size and increase in mispositioned nuclei (Fig 6). Thus these data support defects of the TIAM-RAC1-actin pathway as a primary and main cause of myotubular myopathy. Interestingly, dysregulation of the expression of several actin binding proteins, as cofilin and Arp2/3 subunit ACTR3, was reported in muscle biopsies from patients with myotubular myopathy (Noguchi et al., 2005). As Tiam1 genetic ablation aggravated the *Mtm1*<sup>-y</sup> mouse phenotypes in a dose-dependent manner, we propose TIAM1 could be a modifier gene of this disease.

In conclusion, we reveal defects of the TIAM-RAC1-actin pathway as a novel mechanism causing main hallmarks of myotubular myopathy and representing a potential common pathomechanism in different centronuclear myopathies.

## **Materials and methods**

### **Constructs, chemicals and antibodies**

The mouse TIAM1 specific shRNA plasmid (CAT#: TG511327) and Non-effective 29-mer scrambled shRNA cassette in pGFP-V-RS Vector (TR30013), used as negative control, were purchased from OriGene Technologies. Puromycin (INVIVOGEN, 2 µg/ml) was added to culture media as described below. The RAC1 inhibitor NSC23766 (cat. no. 2161) was purchased from Tocris and received in desiccated state. The NSC23766 was resuspended in sterile water to a 100 mM stock solution and was added to the culture media at different concentrations, as described below.

Primary antibodies used were: anti-Tiam1 rabbit (ST1070, Merck-Millipore), TIAM2 rabbit (EPR16838, Abcam), RAC1 mouse (23a8, Abcam), cofilin rabbit (ab42824, Abcam), phospho-cofilin Ser3 rabbit (77G2, Cell signaling), ACTR3B rabbit (EPR14091, Abcam), YAP1 mouse (63.7, SC-101199, Santa Cruz Biotechnology), phospho-YAP1 S127 rabbit (EP1675Y, Abcam), TAZ (WWTR1) rabbit (HP007415, Merck Millipore), rhodamine phalloidin (PHDR1, cytoskeleton), paxillin rabbit (Y113, abcam) and β-Actin mouse (made onsite at the polyclonal antibody facility of the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire: IGBMC). Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies were purchased from Invitrogen (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, and Alexa Fluor 647). Secondary antibodies against mouse and rabbit immunoglobulin G conjugated with horse-radish peroxidase were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (catalog numbers 115-035-146 and 111-036-045). An enhanced chemiluminescence kit was purchased from Pierce.

## Animals

*Mtm1*<sup>-/-</sup> mouse line (129PAS) was previously described and characterized (Buj-Bello et al., 2002; Tasfaout et al., 2017). C57BL/6NTac-Tiam1<sup>tm1a</sup>(EUCOMM)<sup>Hmgu</sup> (hereafter called *Tiam1*<sup>-/-</sup>) mouse line was generated by the ICS. Briefly, The L1L2\_GT0\_LF2A\_LacZ\_BetactP\_neo cassette was inserted at position 89885740 of Chromosome 16 upstream of the targeted exon 6. The cassette is composed of an FRT site followed by lacZ sequence and a loxP site. This first loxP site is followed by a neomycin resistance gene under the control of the human beta-actin promoter, SV40 polyA, a second FRT site and a second loxP site. A third loxP site is inserted downstream of the targeted exon 6 at position 89884572. The exon 6 is thus flanked by loxP sites. Cre-mediated excision of the parental Tiam1<sup>tm1a</sup>(EUCOMM)<sup>Hmgu</sup> allele resulted in the removal of the promoter-driven neomycin selection cassette and the exon 6, leaving behind the inserted lacZ reporter sequence (Tiam1<sup><tm1a</sup>

(EUCOMM) Hmgu> Targeted Allele Detail MGI Mouse (MGI: 5511857). Animals were kept at room temperature with 12-hour light/ 12-hour dark cycle. Animals were euthanized by cervical dislocation following European legislation on animal experimentation and experiments approved by ethical committees.

### **Primary *Mtm1*<sup>-y</sup> myoblasts**

Primary myoblasts from WT and *Mtm1*<sup>-y</sup> newborn pups (at 3-5 days after birth) were prepared as previously described in Cowling *et al.* (Cowling *et al.*, 2017). After isolation, primary myoblasts were plated onto 1:200 Matrigel reduced factor (BD Biosciences) and laminin (354232, Corning) coated plates, and cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) with 20% fetal calf serum (FCS) and 1% chicken embryo extract (MP Biomedicals).

Primary myoblast differentiation into myotubes was triggered when the cells reached 70% confluence by switching the culture medium to IMDM with 2% horse serum and fed every day with fresh differentiation medium every day until myotubes were fully formed (5 days).

### **C2C12 transfection with shRNA and puromycin selection**

C2C12 mouse myoblasts were plated on 6-well plates in DMEM containing 20% FCS and gentamycin, at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. When the cells reached 50-60% confluence, they were transfected with 1 µg of DNA per well using Lipofectamine 3000 Reagent (Invitrogen). After 24 h in culture, 2 µg/ml of puromycin was added to the medium for selection of the cells carrying the pGFP-RS-shRNA-pU6 plasmid containing the shRNA TIAM1 or scrambled cassettes. After the tenth day following selection, surviving cells were grown to confluence and the expression of turbo-GFP was assessed by qRT-PCR as described below. These cells were then transferred to 6 well plates for adhesion and migration assays, and the remaining cells were frozen at -80°C using culture medium containing 10% (v/v) DMSO.

### **C2C12 treatment with RAC1 NSC23766 inhibitor**

C2C12 mouse myoblasts were plated on 6-well plates in DMEM containing 20% FCS and gentamycin, at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Different concentrations of the RAC1 inhibitor NSC23766 (50, 100, 200 µM) were added to the culture medium, and the cells were grown for 4 h and 18 h

to determine the optimal conditions of the RAC1 inhibition, as described in the supplementary data.

### **RNA isolation and Real-time quantitative PCR**

TA muscles from mice were lysed in TRizol reagent (Invitrogen) to extract RNA and the reverse transcriptase (Thermo Fischer Scientific) was used to obtain the complementary DNA (cDNA). PCR was performed in 96-well plates using diluted cDNA samples, gene-specific primers (Supplementary Table x, see section on supplementary data given at the end of this article) and SYBR Green PCR reagents (QuantiTect SYBR® Green PCR Kits).

### **RNA Extraction and Sequencing**

RNA was extracted from TA muscle by Trizol. RNA sequencing library have been prepared using the TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit and sequenced on a Hiseq4000 as single-end 50 bp reads.

### **Protein extraction and immunoblotting**

TA muscles were lysed in a lysis buffer containing 50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 0.5 mM 1, 4-Dithiothreitol (DTT), 1mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 % glycerol, 0.5 % Sodium dodecyl sulfate (SDS) and 2 % Triton with 1 mM dimethyl sulfoxide, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (cOmplete™, Roche Diagnostics) and phosphatase inhibitor tablets (PhosSTOP™, Merck Millipore) on ice. The protein concentration was measured using the Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad). Loading buffer (Pierce™ Lane Marker, Cat 39000) was added to protein lysates, and proteins were separated by 8, 10 or 12% in SDS–polyacrylamide gel electrophoresis containing TCE to visualize all tryptophan-containing proteins. After transfer to nitrocellulose, membranes were stained with ponceau red (Ref x) before the saturation was performed with 5 % BSA and primary and secondary antibodies were added as follows: TIAM1 (1:500, ST1070), TIAM2 (1:500, EPR16838), RAC1 (1:700, 23a8), cofilin (1:1000, ab42824), phospho-cofilin Ser3 (1:1000, 77G2), ACTR3B (1:700, EPR14091), YAP1 (1:400, SC-101199), phospho-YAP1 S127 (1:1000, EP1675Y), TAZ (1:400, HP007415), paxilline (1: 700, Y113), β-Actin mouse (1:1000,



IGBMC) and MTM1 (1:700, 2827, IGBMC). The secondary antibodies against mouse or rabbit (115-035-146 and 111-036-045) were used at 1:5000.

### **Yeast two-hybrid**

Yeast two-hybrid (Y2H) screening was performed by Hybrigenics Inc., as previously reported in Hnia et al. (Hnia et al., 2011). Briefly, the aa 146–603 of catalytically inactive human MTM1 (C375S mutant) was used as bait and human skeletal muscle cDNA library (Hybrigenics Inc.) was used to screen for potential MTM1 interactors.

### **RAC activity**

Colorimetric G-LISA activity assay kit (Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, catalog number BK 128) was used according to the manufacturer's instructions to quantitatively assess GTP-bound RAC1 in TA muscle from WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice and from C2C12 treated with NSC23766 RAC1 inhibitor. For the mouse TA muscle, the protein lysate was prepared as previously described in Croisé *et al.* (Croisé et al., 2016). Small pieces of frozen TA mouse muscles were weighed and lysed for 15 min on ice (4°C) into Cytoskeleton G-LISA lysis buffer using 40 µl lysis buffer for 1 mg of muscle tissue. Lysates were clarified at 20,000 g, using 2 ml tubes containing CK28 ceramic beads (P000911-LYSK0-A.0, OZYME) for 2 min at 4°C and the supernatants were snap frozen in nitrogen liquid and stored at -80°C until the start of the ELISA assay. Protein amounts were determined using the Precision Red Advanced Protein Assay that came with the kit (Cytoskeleton) and immediately before the assay, protein amount was adjusted to 1.5 µg/ml. The G-LISA assay was performed according to the manufacturer's instructions

For the RAC1 GTPase activity measured in C2C12 cells, after experimental treatment with the RAC1 inhibitor NSC23766, the C2C12 cells were washed with ice-cold (4°C) PBS 1X and then lysed in ice-cold lysis buffer. The lysates were clarified at 10,000 g for 1 min at 4°C and snap frozen in nitrogen liquid and stored at -80°C until the start of the ELISA assay. Protein amounts were determined using the Precision Red Advanced Protein Assay that came with the kit (Cytoskeleton) and immediately before the assay, protein amount was adjusted to 1 µg/ml. The G-LISA assay was performed according to the manufacturer's instructions.

### **G/F-actin ratio in muscle**

The relative proportions of F-actin and G-actin in mouse TA muscles were analyzed using an assay kit from Cytoskeleton (Denver, CO, USA) following the manufacturer's protocol. Briefly, each of the muscle TA was lysed in 600  $\mu$ l of LAS2 buffer pre-warmed to 37°C prior to the start of the assay, and incubated at 37°C for 10 min. After centrifuging the lysates to pellet of unbroken muscles, 500  $\mu$ l of the lysates were centrifuged to 100,000 g, 37°C for 60 min, to separate F-actin from soluble G-actin. The F-actin containing fraction was resuspended in 500  $\mu$ l of ice-cold F-actin depolymerization buffer supplied in the kit for 60 min, on ice (4°C). Western blot analysis was performed using anti-actin antibody supplied in the kit (Cat. # AAN01).

### **Cell adhesion and migration assays**

The experiments are conducted according to the protocol adapted from Lionello et al. (Lionello et al., 2019). The adhesion and migration experiments were both performed on transfected and puromycin selected C2C12 and on RAC1 NSC23766 treated C2C12. For C2C12 puromycin selected, cells were trypsinized and resuspended in DMEM containing 20% FCS and 2  $\mu$ g/ml puromycin. For C2C12 treated with RAC1 inhibitor, the cells were resuspended in DMEM containing 20% FCS and 100  $\mu$ M of NSC23766. For adhesion assay,  $2.5 \times 10^4$  of cells were plated onto laminin coated dishes. Cells were let to adhere for 10 and 60 min after plating, at 37°C and 4% CO<sub>2</sub>. C2C12 were then washed with RT medium and fixed 4% paraformaldehyde (PFA). Immunofluorescence was performed as described below. After confocal imaging, the cell surface was measured using Fiji software.

For migration assays,  $1.2 \times 10^4$  of C2C12 were plated onto matrigel or laminin coated 6 well-plates in DMEM containing 20% FCS and 2  $\mu$ g/ml puromycin or DMEM containing 20% FCS and 100  $\mu$ M of NSC23766, for C2C12 puromycin selected and RAC1 inhibitor treated, respectively. Migration of the cells was followed by time lapse with a Leica microscope for 24 hours. Images were taken in an interval of 15 min. The C2C12 velocity was measured using Fiji software.

### **Immunofluorescence and microscopy**

Immunofluorescence analyses were conducted on primary WT and Mtm1-/- myoblasts and myotubes as well as on shRNA transfected and RAC1 NSC23766 treated C2C12. The cells were fixed in PFA 4% for 20 min at RT, and permeabilized with 0.2 % PBS-Triton X-100 for 10 min and then saturated in 5% bovine serum albumin (BSA) in 0.1 % PBS-Triton X-100. The primary

antibodies were diluted in 5% BSA in 0.1 % PBS-Triton as follows: YAP1 (1: 100, SC-101199), TAZ (1:100, HP007415), paxillin (1:150, Y113), rhodamine phalloidin (1:250, PHDR1), DAPI (1:1000). The secondary antibodies were anti-mouse or -rabbit, and Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, and Alexa Fluor 647 were diluted 1:250 in 5% BSA in 0.1 % PBS-Triton. After confocal acquisition, the cell phenotypes were analyzed using Fiji. To analyze the number of actin aggregates per cell, the point maxima were set as follows: process > find maxima > prominence 30 > strict. To determine the number of focal adhesions stained with paxillin antibody, the background of the images was subtracted in Fiji and then the point maxima were set as follows: process > find maxima > prominence 80 > strict. To quantify the YAP/TAZ nucleocytoplasmic ratio, using Fiji software, nuclei were outlined on DAPI staining and maximum intensity of YAP and TAZ fluorescence was measured in the corresponding regions of interest (ROIs). Maximum intensity of the same cytoplasm was quantified as well and then the ratio of nuclei/cytoplasm localization was calculated.

### **Muscle histology**

Cervical dislocation was used to euthanize mice after carbon dioxide suffocation. TA muscles were extracted and frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen, then stored at -80°C. Eight-micrometer cryosections of TA were cut stained with H&E and SDH for histological analysis. After staining, the images were acquired with the Hamamatsu Nano Zoomer 2HT slide scanner. The percentage of internalized nuclei was counted using cell counter plugin in Fiji software. The TA fiber diameter was measured by hand after outlining each muscle fiber in Fiji software (min ferret diameter). To determine the fiber diameter, > 300 fiber were analyzed per mouse genotype. The percentage of TA muscle fibers with abnormally localized nuclei (internalized or centralized) was counted in > 400 fibers per genotype using the cell counter plugin in Fiji.

### **Mice phenotyping**

The phenotyping experiments were conducted blinded, and all the experiments were repeated three times for each mouse to ensure reproducibility. The experiments were performed every week at the same day of the week. The phenotyping tests that were performed were: hanging, grip, Rotarod, Open Field (Whole arena average speed, total distance travelled, number of rears) tests. The ganging test was performed every week from 3 to 16 weeks. The mice were suspended from a cage

lid for maximum 60 s, and the test was repeated three times. The average time each mouse fall from the grid is presented in the graph. The grip test was conducted at 9 weeks. The four-paw strength was measured using a dynamometer, and the test was repeated three times for each animal. The mean of the three repetitions is reported in the graph. Results are represented as force relative to body weight in grams

The rotarod test was conducted at 9 weeks. The mice performed the test for 5 days. During day 1, mice were trained to run in acceleration mode on the rotarod. From days 2 to 5, mice ran for a maximum of 5 min with increasing speed (4 to 40 rpm). Each mouse performed the test three times, and the average of three repetitions was represented. Mice who were still on the road after 5 min were assigned the latency to fall time of 300 s. The Open Field test assess the exploratory behavior of the animal. The mice are put in an open field arena for 20 min where each mouse is video-tracked, and the system records parameters like the distance travelled, the average speed inside the arena and the number of rears, which all reflect the locomotor activity as well as the exploratory behaviors of the animals.

## Statistical analyses

The data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Graph and curves were made using GraphPad Prism software versions 5&6. The Mann Whitney and unpaired students T-tests were performed to compare two groups. Non parametric test and Kruskal Wallis post-hoc with Dunn's correction were used to compare different groups. One-way ANOVA and Kruskal Wallis test post-hoc were used to compare different groups if the data followed a normal distribution and if the samples analyzed had the same genetic background. P values smaller than 0.05 were considered significant. The number of mice and the tests used for each experiments are listed for each experiment in the figure legends.

## Supplementary Materials

Table S1: Primer list used in RT-qPCR analyses

Fig. S1. The RAC1-actin pathway is altered in *Mtm1*<sup>-y</sup> mice

Fig. S2. The YAP/TAZ pathway is dysregulated in *Mtm1*<sup>-y</sup> mice

Fig. S3. TIAM1 knock-down and RAC1 inhibition induce a myotubular myopathy-like defects in cells

Fig. S4. TIAM1 downregulation decreases the lifespan and worsens motor and histological defects of *Mtm1*<sup>-/y</sup> mice

Movie S1 *Tiam1* decrease aggravates the motor phenotypes of the myotubular myopathy in *Mtm1*<sup>-/y</sup> *Tiam1*<sup>+/-</sup> mice.

## Acknowledgements

We would like to thank Marcel Boeglin and Yves Lutz for imaging, David Reiss, Tania Sorg, Mohammed Selloum and the IMPC consortium for the *Tiam1* floxed mouse, Hybrigenics for the yeast two-hybrid, Céline Keime and Genomeast for RNAseq, and IGBMC and ICS platforms for animal house, imaging and histology. This study was supported by INSERM, CNRS, Strasbourg University, ANR Dynamuscle (ANR-14-CE12-0009-01) and ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d’Avenir ANR-10-IDEX-0002-02, the French National Infrastructure for Mouse Phenogenomics (PHENOMIN), Fondation Recherche Médicale (FRM EQU201903007992), and AFM-Téléthon (22734).

## Author’s contribution

JL conceived and supervised the project. MCB, MWD and YH contributed material. S Djerroud, MC, CG, CK, AM performed the experiments. S Djerroud, S Djeddi, AM, FR and JL analyzed the data. S Djerroud and JL wrote the manuscript.

## References

- Al-Qusairi, L., Weiss, N., Toussaint, A., Berbey, C., Messaddeq, N., Kretz, C., Sanoudou, D., Beggs, A.H., Allard, B., Mandel, J.L., et al. (2009). T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 18763–18768.
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., and Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*

393, 805–809.

Baumeister, M.A., Martinu, L., Rossman, K.L., Sondek, J., Lemmon, M.A., and Chou, M.M. (2003). Loss of phosphatidylinositol 3-phosphate binding by the C-terminal Tiam-1 pleckstrin homology domain prevents in vivo Rac1 activation without affecting membrane targeting. *J. Biol. Chem.* *278*, 11457–11464.

Becky, D., Gyulai-Nagy, S., Balind, A., Horvath, P., Dux, L., and Keller-Pinter, A. (2020). Myoblast migration and directional persistence affected by syndecan-4-mediated tiam-1 expression and distribution. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 1–12.

Berrier, A.L., Martinez, R., Bokoch, G.M., and LaFlamme, S.E. (2002). The integrin  $\beta$  tail is required and sufficient to regulate adhesion signaling to Rac1. *J. Cell Sci.* *115*, 4285–4291.

Blondeau, F., Laporte, J., Bodin, S., Superti-Furga, G., Payrastre, B., and Mandel, J.L. (2000). Myotubularin, a phosphatase deficient in myotubular myopathy, acts on phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 3-phosphate pathway. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 2223–2229.

Buj-Bello, A., Laugel, V., Messaddeq, N., Zahreddine, H., Laporte, J., Pellissier, J.F., and Mandel, J.L. (2002). The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15060–15065.

Charrasse, S., Comunale, F., Fortier, M., Portales-Casamar, E., Debant, A., and Gauthier-Rouvière, C. (2007). M-Cadherin Activates Rac1 GTPase through the Rho-GEF Trio during Myoblast Fusion. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1734–1743.

Cowling, B.S., Chevremont, T., Prokic, I., Kretz, C., Ferry, A., Coirault, C., Koutsopoulos, O., Laugel, V., Romero, N.B., and Laporte, J. (2014). Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J. Clin. Invest.* *124*, 1350–1363.

Cowling, B.S., Prokic, I., Tasfaout, H., Rabai, A., Humbert, F., Rinaldi, B., Nicot, A.-S., Kretz, C., Friant, S., Roux, A., et al. (2017). Amphiphysin (BIN1) negatively regulates dynamin 2 for normal muscle maturation. *J. Clin. Invest.* *127*, 4477–4487.

Croisé, P., Houy, S., Gand, M., Lanoix, J., Calco, V., Tóth, P., Brunaud, L., Lomazzi, S., Paramithiotis, E., Chelsky, D., et al. (2016). Cdc42 and Rac1 activity is reduced in human pheochromocytoma and correlates with FARP1 and ARHGEF1 expression. *Endocr. Relat. Cancer* *23*, 281–293.

D’Alessandro, M., Hnia, K., Gache, V., Koch, C., Gavriilidis, C., Rodriguez, D., Nicot, A.S., Romero, N.B., Schwab, Y., Gomes, E., et al. (2015). Amphiphysin 2 Orchestrates Nucleus

Positioning and Shape by Linking the Nuclear Envelope to the Actin and Microtubule Cytoskeleton. *Dev. Cell* 35, 186–198.

Dasgupta, I., and McCollum, D. (2019). Control of cellular responses to mechanical cues through YAP/TAZ regulation. *J. Biol. Chem.* 294, 17693–17706.

Dowling, J.J., Vreede, A.P., Low, S.E., Gibbs, E.M., Kuwada, J.Y., Bonnemann, C.G., and Feldman, E.L. (2009). Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet.* 5.

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., et al. (2012). Myotubular myopathy and the neuromuscular junction : a novel therapeutic approach from mouse models. 859, 852–859.

Falcone, S., Roman, W., Hnia, K., Gache, V., Didier, N., Lainé, J., Auradé, F., Marty, I., Nishino, I., Charlet-Berguerand, N., et al. (2014). N- WASP is required for Amphiphysin-2/ BIN 1-dependent nuclear positioning and triad organization in skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy . *EMBO Mol. Med.* 6, 1455–1475.

Fetalvero, K.M., Yu, Y., Goetschkes, M., Liang, G., Valdez, R.A., Gould, T., Triantafellow, E., Bergling, S., Loureiro, J., Eash, J., et al. (2013). Defective Autophagy and mTORC1 Signaling in Myotubularin Null Mice. *Mol. Cell. Biol.* 33, 98–110.

Fleming, I.N., Batty, I.H., Prescott, A.R., Gray, A., Kular, G.S., Stewart, H., and Downes, C.P. (2004). Inositol phospholipids regulate the guanine-nucleotide-exchange factor Tiam1 by facilitating its binding to the plasma membrane and regulating GDP/GTP exchange on Rac1. *Biochem. J.* 382, 857–865.

Franck, A., Laine, J., Moulay, G., Trichet, M., Gentil, C., Fongy, A., Bigot, A., Benkhelifa-Ziyyat, S., Lacene, E., Bui, M.T., et al. (2018). Clathrin plaques form mechanotransducing platforms. *BioRxiv* 33, 321885.

Franck, A., Lainé, J., Moulay, G., Lemerle, E., Trichet, M., Gentil, C., Benkhelifa-Ziyyat, S., Lacène, E., Bui, M.T., Brochier, G., et al. (2019). Clathrin plaques and associated actin anchor intermediate filaments in skeletal muscle. *Mol. Biol. Cell* 30, 579–590.

Gao, Y., Dickerson, J.B., Guo, F., Zheng, J., and Zheng, Y. (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 7618–7623.

Gavriilidis, C., Laredj, L., Solinhac, R., Messaddeq, N., Viaud, J., Laporte, J., Sumara, I., and

Hnia, K. (2018). The MTM1-UBQLN2-HSP complex mediates degradation of misfolded intermediate filaments in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* *20*, 198–210.

González-Jamett, A.M., Baez-Matus, X., Olivares, M.J., Hinojosa, F., Guerra-Fernández, M.J., Vasquez-Navarrete, J., Bui, M.T., Guicheney, P., Romero, N.B., Bevilacqua, J.A., et al. (2017). Dynamin-2 mutations linked to Centronuclear Myopathy impair actin-dependent trafficking in muscle cells. *Sci. Rep.* *7*, 4580.

Gu, C., Yaddanapudi, S., Weins, A., Osborn, T., Reiser, J., Pollak, M., Hartwig, J., and Sever, S. (2010). Direct dynaming-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.* *29*, 3593–3606.

Hnia, K., Tronchère, H., Tomczak, K.K., Amoasii, L., Schultz, P., Beggs, A.H., Payrastre, B., Mandel, J.L., and Laporte, J. (2011). Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* *121*, 70–85.

Hodge, R.G., and Ridley, A.J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 496–510.

Hoshino, M., Sone, M., Fukata, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Nabeshima, Y., and Hama, C. (1999). Identification of the *stef* Gene That Encodes a Novel Guanine Nucleotide Exchange Factor Specific for Rac1. *J. Biol. Chem.* *274*, 17837–17844.

Janota, C.S., Calero-Cuenca, F.J., and Gomes, E.R. (2020). The role of the cell nucleus in mechanotransduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* *63*, 204–211.

Joshi, S., Davidson, G., Le Gras, S., Watanabe, S., Braun, T., Mengus, G., and Davidson, I. (2017). TEAD transcription factors are required for normal primary myoblast differentiation in vitro and muscle regeneration in vivo.

Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C., and Laporte, J. (2008). Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J. Rare Dis.* *3*, 26.

Jungbluth, H., Treves, S., Zorzato, F., Sarkozy, A., Ochala, J., Sewry, C., Phadke, R., Gautel, M., and Muntoni, F. (2018). Congenital myopathies: Disorders of excitation-contraction coupling and muscle contraction. *Nat. Rev. Neurol.* *14*, 151–167.

Ketel, K., Krauss, M., Nicot, A.-S., Puchkov, D., Wieffer, M., Müller, R., Subramanian, D., Schultz, C., Laporte, J., and Haucke, V. (2016). A phosphoinositide conversion mechanism for exit from endosomes. *Nature* *529*, 408–412.



Ten Klooster, J.P., Evers, E.E., Janssen, L., Machesky, L.M., Michiels, F., Hordijk, P., and Collard, J.G. (2006). Interaction between Tiam1 and the Arp2/3 complex links activation of Rac to actin polymerization. *Biochem. J.* *397*, 39–45.

Kutchukian, C., Szentesi, P., Allard, B., Buj-Bello, A., Csernoch, L., and Jacquemond, V. (2019). Ca<sup>2+</sup>-induced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in myotubularin-deficient muscle fibers. *Cell Calcium* *80*, 91–100.

Laporte, J., Hu, L.J., Kretz, C., Mandel, J.L., Kioschis, P., Coy, J.F., Klauck, S.M., Poustka, A., and Dahl, N. (1996). A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.* *13*, 175–182.

Laporte, J., Blondeau, F., Gansmuller, A., Lutz, Y., Vonesch, J.L., and Mandel, J.L. (2002). The PtdIns3P phosphate myotubularin is a cytoplasmic protein that also localizes to Rac1-inducible plasma membrane ruffles. *J. Cell Sci.* *115*, 3105–3117.

Lawlor, M.W., Beggs, A.H., Buj-Bello, A., Childers, M.K., Dowling, J.J., James, E.S., Meng, H., Moore, S.A., Prasad, S., Schoser, B., et al. (2016). Skeletal muscle pathology in X-linked myotubular myopathy: Review with cross-species comparisons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *75*, 102–110.

Lionello, V.M., Nicot, A.S., Sartori, M., Kretz, C., Kessler, P., Buono, S., Djerroud, S., Messaddeq, N., Koebel, P., Prokic, I., et al. (2019). Amphiphysin 2 modulation rescues myotubular myopathy and prevents focal adhesion defects in mice. *Sci. Transl. Med.* *11*.

Marei, H., and Malliri, A. (2017). GEFs: Dual regulation of Rac1 signaling. *Small GTPases* *8*, 90–99.

Meriane, M., Roux, P., Primig, M., Fort, P., and Gauthier-Rouvière, C. (2000). Critical Activities of Rac1 and Cdc42Hs in Skeletal Myogenesis: Antagonistic Effects of JNK and p38 Pathways. *Mol. Biol. Cell* *11*, 2513–2528.

Neukomm, L.J., Nicot, A.S., Kinchen, J.M., Almendinger, J., Pinto, S.M., Zeng, S., Doukoumetzidis, K., Tronchère, H., Payrastra, B., Laporte, J.F., et al. (2011). The phosphoinositide phosphatase MTM-1 regulates apoptotic cell corpse clearance through CED-5-CED-12 in *C. elegans*. *Development* *138*, 2003–2014.

Noguchi, S., Fujita, M., Murayama, K., Kurokawa, R., and Nishino, I. (2005). Gene expression analyses in X-linked myotubular myopathy. *Neurology* *65*, 732–737.

Ribeiro, I., Yuan, L., Tanentzapf, G., Dowling, J.J., and Kiger, A. (2011). Phosphoinositide

Regulation of Integrin Trafficking Required for Muscle Attachment and Maintenance. *PLoS Genet.* 7, e1001295.

Robb, S.A., Sewry, C.A., Dowling, J.J., Feng, L., Cullup, T., Lillis, S., Abbs, S., Lees, M.M., Laporte, J., Manzur, A.Y., et al. (2011). Impaired neuromuscular transmission and response to acetylcholinesterase inhibitors in centronuclear myopathies. *Neuromuscul. Disord.* 21, 379–386.

Roman, W., and Gomes, E.R. (2018). Nuclear positioning in skeletal muscle. *Semin. Cell Dev. Biol.* 82, 51–56.

Roman, W., Martins, J.P., Carvalho, F.A., Voituriez, R., Abella, J.V.G., Santos, N.C., Cadot, B., Way, M., and Gomes, E.R. (2017). Myofibril contraction and crosslinking drive nuclear movement to the periphery of skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 19, 1189–1201.

Roman, W., Martins, J.P., and Gomes, E.R. (2018). Local Arrangement of Fibronectin by Myofibroblasts Governs Peripheral Nuclear Positioning in Muscle Cells. *Dev. Cell* 46, 102–111.e6.

Romero, N.B. (2010). Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul. Disord.* 20, 223–228.

Royer, B., Hnia, K., Gavriilidis, C., Tronchère, H., Tosch, V., and Laporte, J. (2013). The myotubularin–amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO Rep.* 14, 907–915.

Schartner, V., Laporte, J., and Böhm, J. (2019). Abnormal Excitation-Contraction Coupling and Calcium Homeostasis in Myopathies and Cardiomyopathies. *J. Neuromuscul. Dis.* 6, 289–305.

Sun, C., De Mello, V., Mohamed, A., Ortuste Quiroga, H.P., Garcia-Munoz, A., Al Bloshi, A., Tremblay, A.M., von Kriegsheim, A., Collie-Duguid, E., Vargesson, N., et al. (2017). Common and Distinctive Functions of the Hippo Effectors Taz and Yap in Skeletal Muscle Stem Cell Function. *Stem Cells* 35, 1958–1972.

Tasfaout, H., Buono, S., Guo, S., Kretz, C., Messaddeq, N., Booten, S., Greenlee, S., Monia, B.P., Cowling, B.S., and Laporte, J. (2017). Antisense oligonucleotide-mediated Dnm2 knockdown prevents and reverts myotubular myopathy in mice. *Nat. Commun.* 8, 15661.

Tasfaout, H., Cowling, B.S., and Laporte, J. (2018). Centronuclear myopathies under attack: A plethora of therapeutic targets. *J. Neuromuscul. Dis.* 5, 387–406.

Taylor, G.S., Maehama, T., and Dixon, J.E. (2000). Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger,

phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 8910–8915.

Totaro, A., Panciera, T., and Piccolo, S. (2019). Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts YAP / TAZ upstream signals and downstream responses. *20*, 888–899.

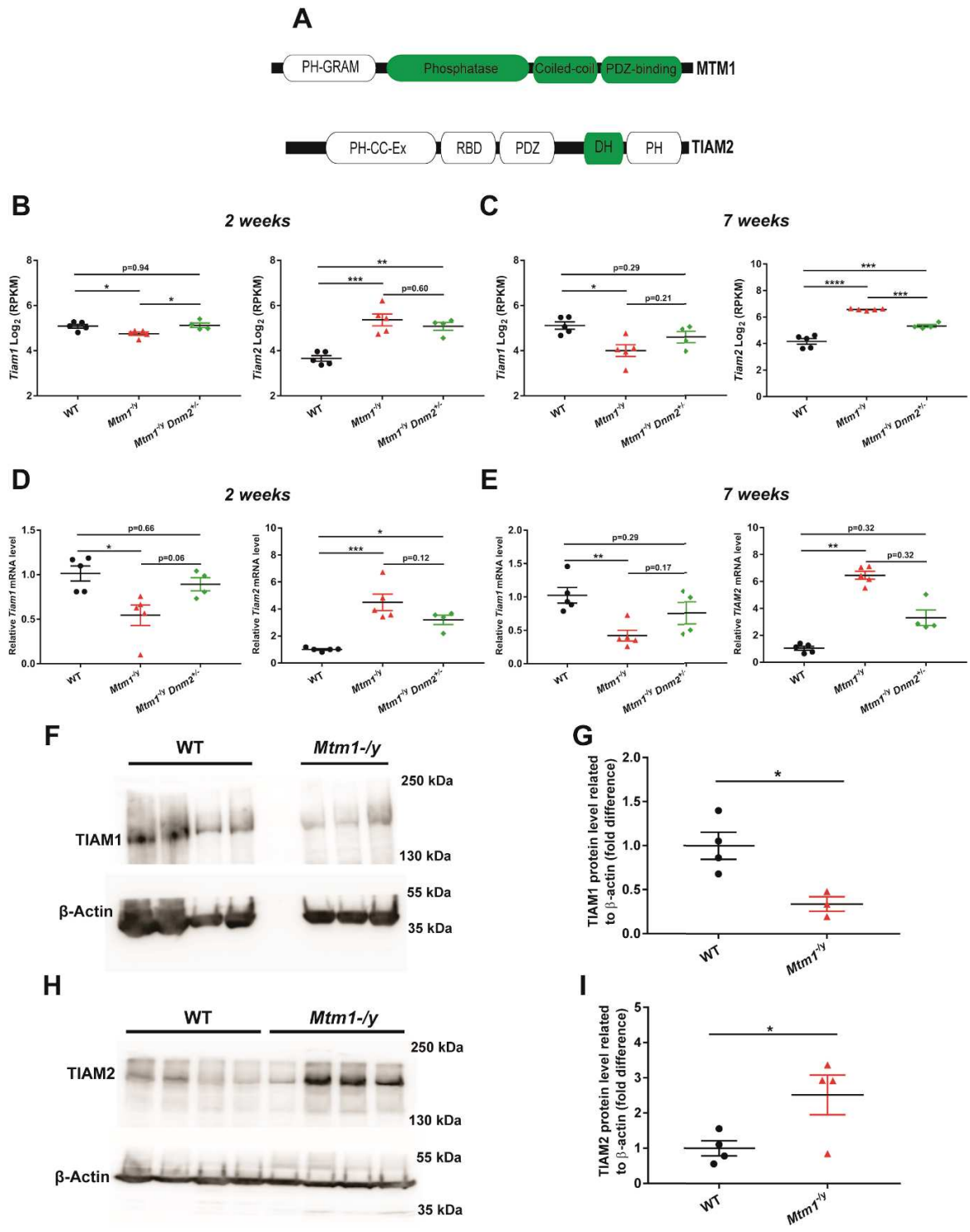
Vasyutina, E., Martarelli, B., Brakebusch, C., Wende, H., and Birchmeier, C. (2009). The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 8935–8940.

Viaud, J., Boal, F., Tronchère, H., Gaits-Iacovoni, F., and Payrastre, B. (2014). Phosphatidylinositol 5-phosphate: A nuclear stress lipid and a tuner of membranes and cytoskeleton dynamics. *BioEssays* *36*, 260–272.

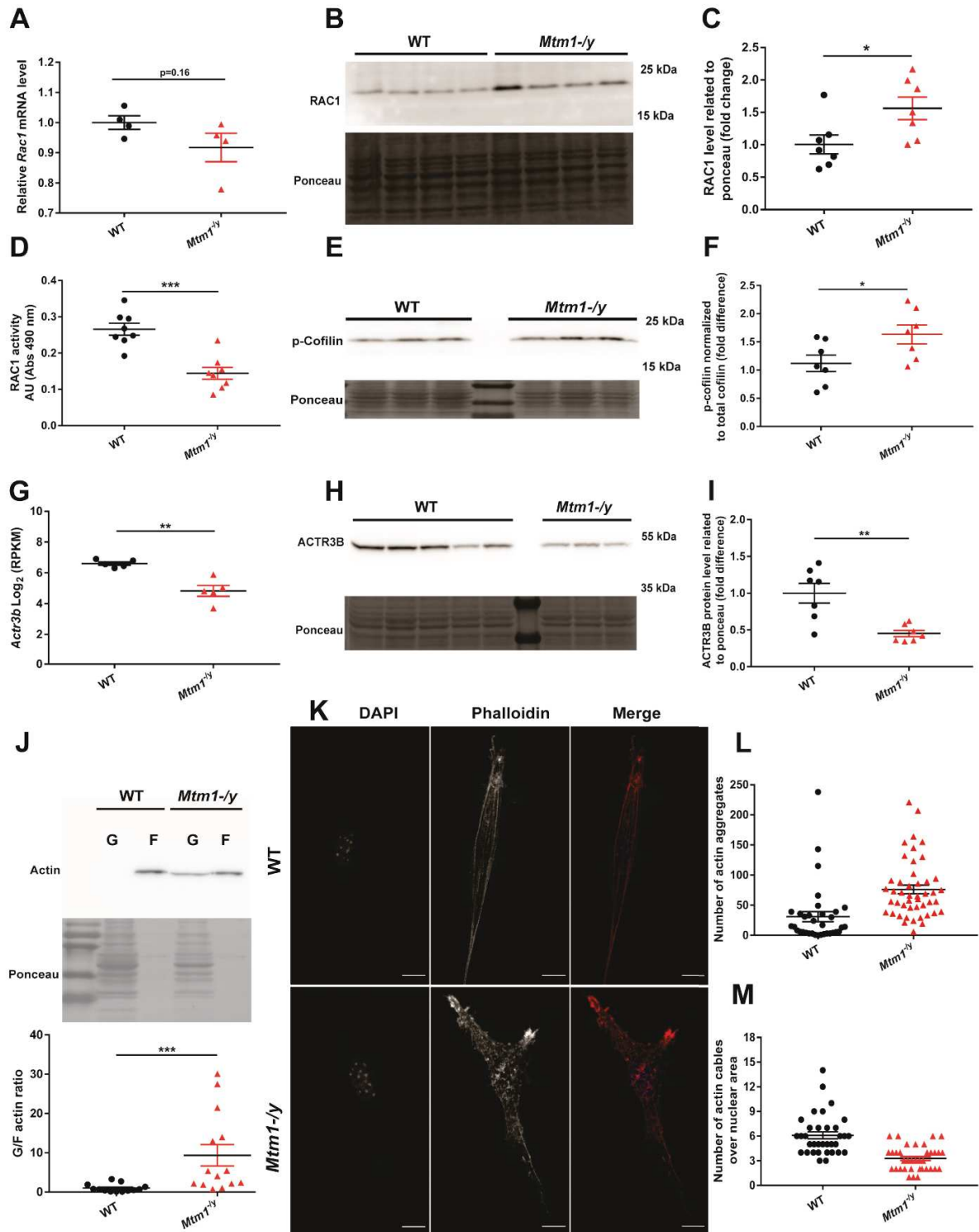
Watt, K.I., Judson, R., Medlow, P., Reid, K., Kurth, T.B., Burniston, J.G., Ratkevicius, A., Bari, C. De, and Wackerhage, H. (2010). Yap is a novel regulator of C2C12 myogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *393*, 619–624.

Woroniuk, A., Porter, A., White, G., Newman, D.T., Diamantopoulou, Z., Waring, T., Rooney, C., Strathdee, D., Marston, D.J., Hahn, K.M., et al. (2018). STEF/TIAM2-mediated Rac1 activity at the nuclear envelope regulates the perinuclear actin cap. *Nat. Commun.* *9*, 1–15.

Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., and Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* *393*, 809–812.

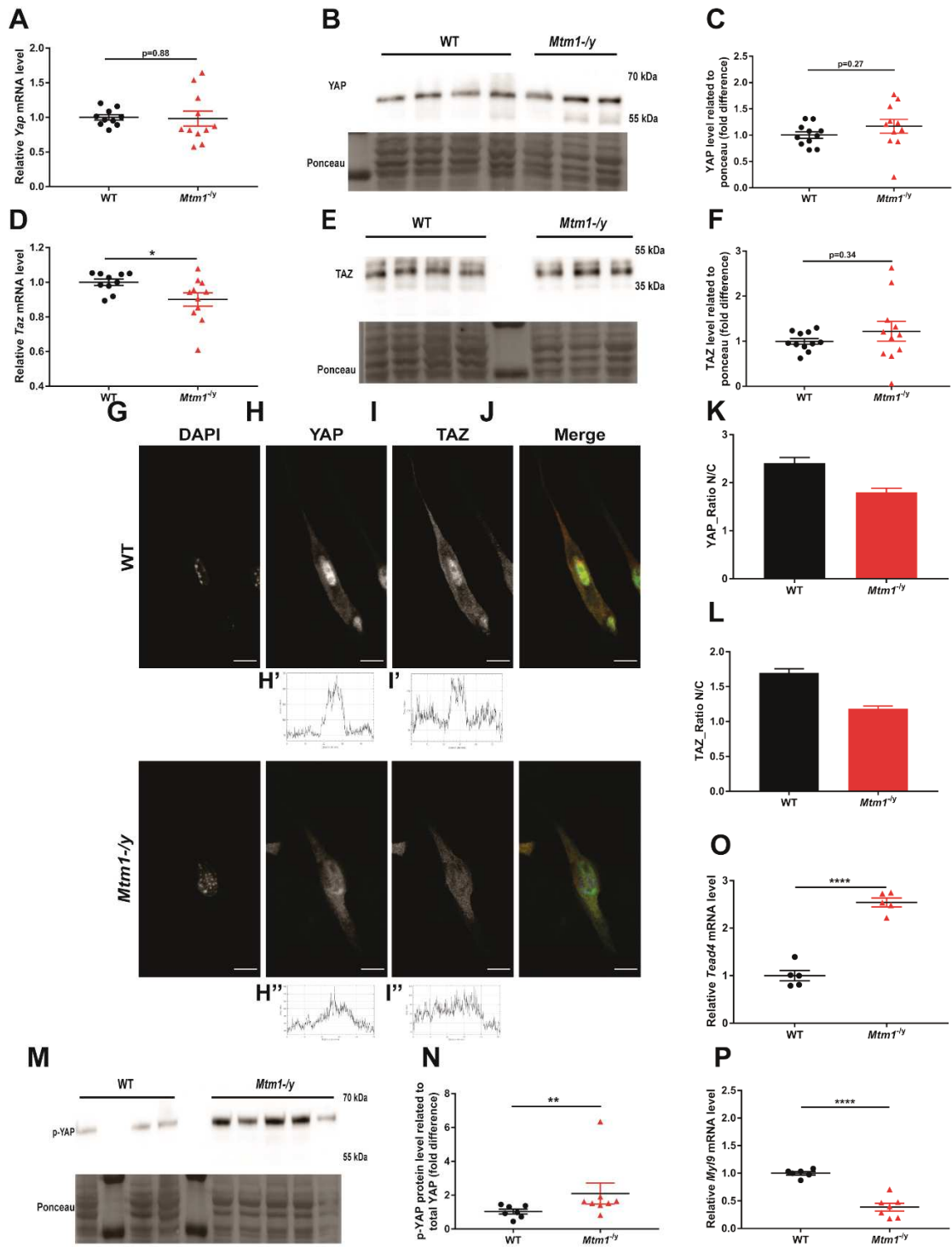


**Fig.1. TIAM expression is dysregulated in *Mtm1*<sup>-ly</sup> mouse muscles.** (A) A yeast two-hybrid screen identified the interaction of aa 150–603 of human MTM1 with aa 998-1171 (DH domain) of TIAM2 (maximal interacting domains in green). (B, C) RNAseq analyses, expressed as Log<sub>2</sub> RPKM, of *Tiam1* and *Tiam2* in TA muscles of WT, *Mtm1*<sup>-ly</sup> and *Mtm1*<sup>-ly</sup>*Dnm2*<sup>-/+</sup> mice at 2 (pre-symptomatic) and 7 weeks (symptomatic) of age (n>4). (D, E) Quantitative RT-PCR of *Tiam1* and *Tiam2* RNAs in TA muscle at 2 and 7 weeks (n>4). (F) Western blot probed with anti-TIAM1 and β-actin antibodies. (G) Quantification of TIAM1 normalized to β-actin protein level (n>3). (H) Western blot probed with anti-TIAM2 and β-actin antibodies. (I) Quantification of TIAM2 normalized to β-actin protein level (n=4). Statistical analyses: Unpaired t test (G, I), One-way ANOVA with Tukey's post hoc test (B, C, D) and Nonparametric Kruskal-Wallis test (E) were performed. \*P<0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.



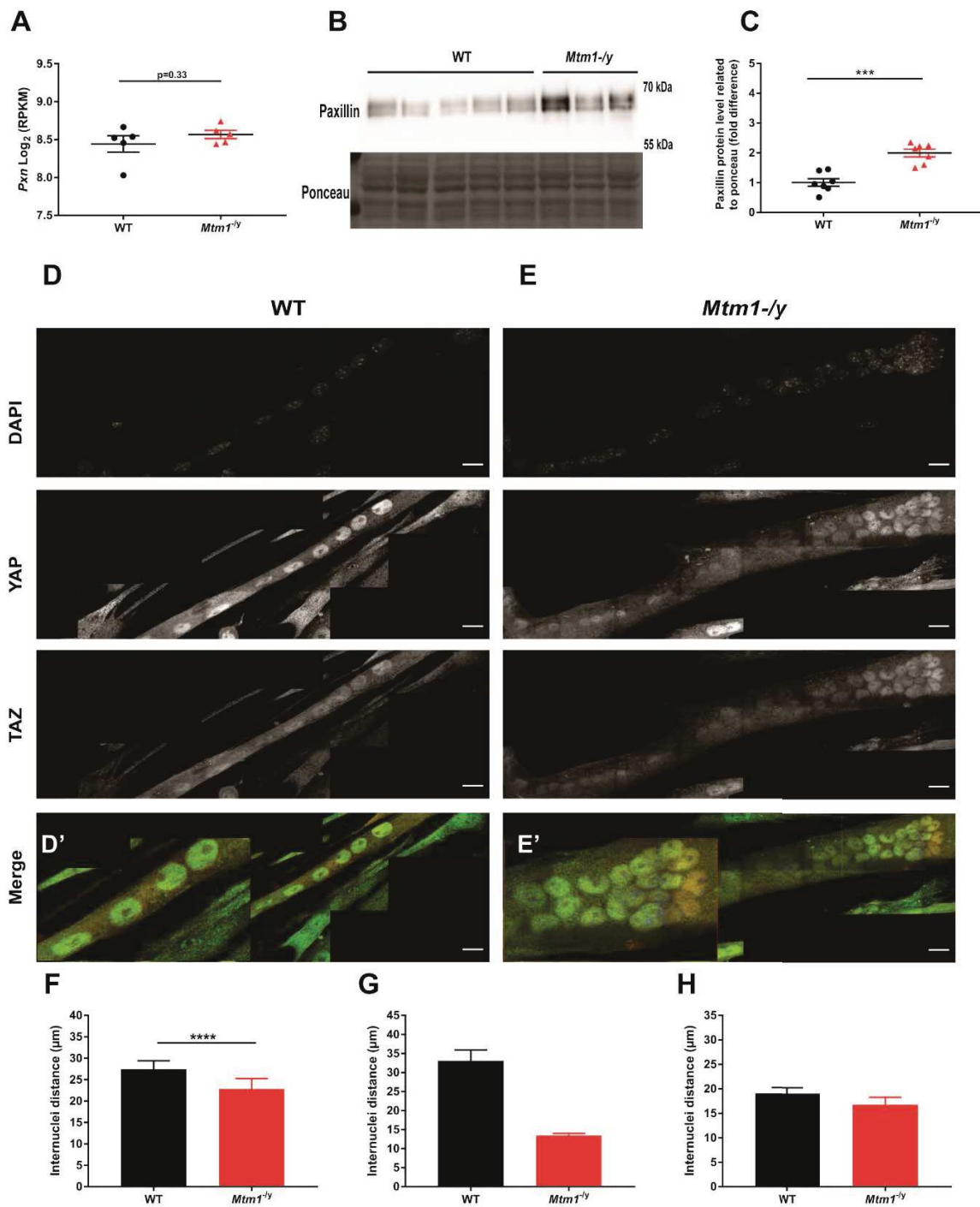
**Fig.2. The RAC1-Actin pathway is altered in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Quantitative RT-PCR of *Rac1* RNA in TA muscles from WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice at 7 weeks (n=4). (B) Western blot probed with anti-RAC1

antibody. **(C)** Quantification of RAC1 normalized to the Ponceau stain of the same gel. **(D)** Activation of RAC1 was examined in TA muscle from WT and *Mtm1<sup>-/-</sup>*, as described in Methods (n=8). **(E)** Western blot probed with anti-phospho-cofilin (Ser-3) antibody. **(F)** Quantification of phospho-cofilin (Ser-3) normalized to total cofilin (supplementary Fig 1) (n=7). **(G)** RNAseq analysis of *Actr3b* gene expression, data expressed as Log<sub>2</sub> RPKM (n=5). **(H)** Western blot probed with anti-ACTR3B antibody. **(I)** Quantification of ACTR3B normalized to Ponceau of the same gel. **(J)** Western blot probed with anti-actin antibody and the quantification of the G-actin/F-actin ratio in TA muscles from WT and *Mtm1<sup>-/-</sup>* mice. **(K)** WT and *Mtm1<sup>-/-</sup>* primary myoblasts stained with DAPI and phalloidin, showing a reduction in actin stress fibers and increase in actin aggregates in *Mtm1<sup>-/-</sup>* myoblasts (lower panel) compared to WT (upper panel). Scale bars, 14 μm. **(L)** Quantification of actin aggregates in WT and *Mtm1<sup>-/-</sup>* myoblasts, as described in methods (n>34 cells from n=1 replicate). **(M)** Quantification of actin cables over nuclear area (n>34 cells from n=1 replicate). Statistical analyses: Unpaired t test (**A, C, D, F**) and Unpaired t test with Welch's correction (**G, I**), and Mann Whitney tests (**J, L, M**) were performed. \*P<0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.



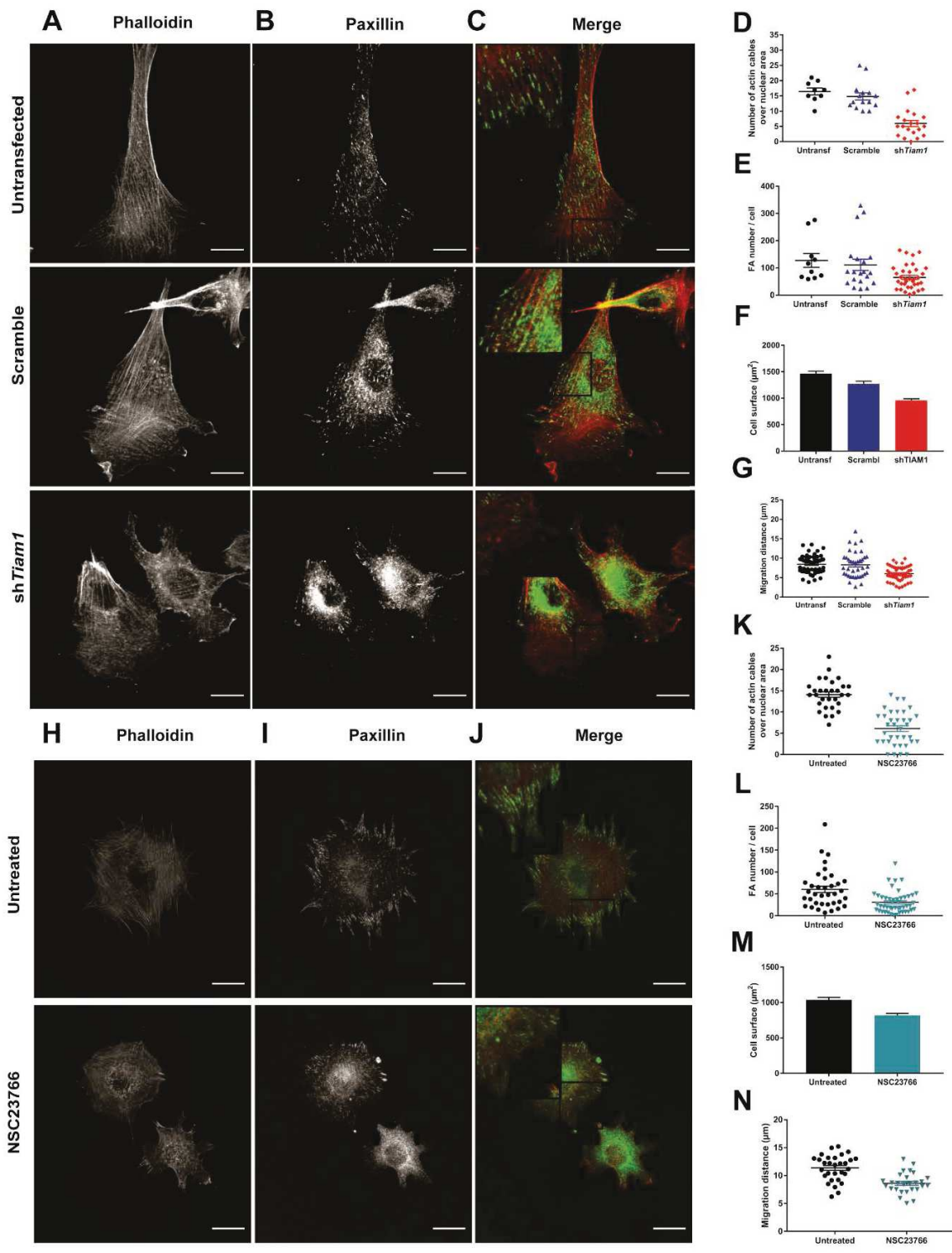


**Fig.3. The YAP/TAZ pathway is dysregulated in *Mtm1<sup>-/-</sup>* mice.** (A) Quantitative RT-PCR of *Yap1* RNA in TA muscle from WT and *Mtm1<sup>-/-</sup>* mice at 7 weeks (n>10). (B) Western blot probed with anti-YAP1 antibody. (C) Quantification of YAP1 normalized to the Ponceau stain of the same gel (n=11). (D) Quantitative RT-PCR of *Taz* RNA (n>10). (E) Western blot probed with anti-TAZ antibody. (F) Quantification of TAZ normalized to the Ponceau stain of the same gel (n=11). (G-J) WT and *Mtm1<sup>-/-</sup>* primary myoblasts probed for DAPI, TAZ and YAP antibodies. Scale bars, 14  $\mu$ m. (H', I', H'', I'') show gray value plots of the nucleocytoplasmic distribution of YAP and TAZ in the primary WT and *Mtm1<sup>-/-</sup>* myoblasts. (K, L) Quantification of the ratio of nuclear/cytoplasm localization of YAP and TAZ, respectively, in primary WT and *Mtm1<sup>-/-</sup>* myoblasts (n>45 cells from n=1). (M) Western blot probed with anti-phospho-YAP (S127) antibody. (N) Quantification of phospho-YAP (Ser127) normalized to total YAP (supplementary Fig3) (n>7). (O, P) Quantitative RT-PCR of *Tead4* (transcription factor) and *Myl9* (YAP/TAZ target gene) (n>5). Statistical analyses: Unpaired t-test (O, P), Unpaired t test with Welch's correction (A, C, D, F) and Mann Whitney tests (K, L, N) were performed. \*P<0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*\*P < 0.0001.



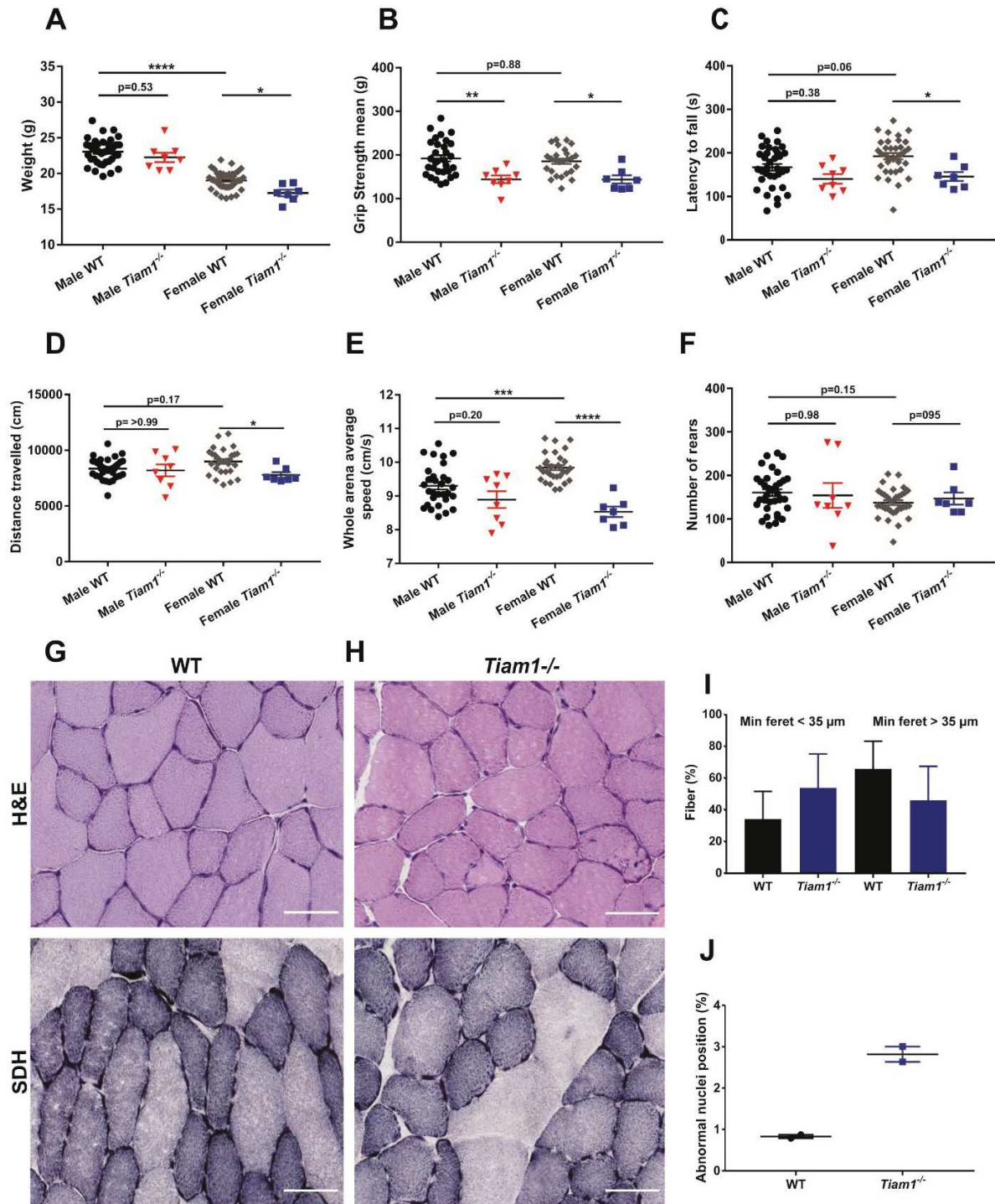
**Fig.4. Paxillin expression defects and abnormal positioning of nuclei in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice. (A)** RNAseq analysis of *Pxn* (*paxillin*) gene expression in WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> TA muscles; data expressed as Log<sub>2</sub>

RPKM (n=5). **(B)** Western blot probed with anti-paxillin antibody. **(C)** Quantification of paxillin normalized to the Ponceau of the same gel (n=7). **(D, E)** WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> primary myotubes at 3 days post differentiation induction, probed for DAPI, YAP & TAZ, and showing mispositioning of nuclei (“bags of nuclei”) in *Mtm1*<sup>-/-</sup> myotubes (right panel) as compared to WT. Scale bars, 14 μm. **(D’ and E’)** high magnification (x2) of a region containing nuclei. **(F, G, H)** Quantification of the internuclei distance (measured between the closest consecutive nuclei) at 1 day (n> 33 myotubes from n=3 replicates), 3 days (n>13 myotubes from n=1 replicate) and 5 days (n>10 myotubes from n=1 replicate) post differentiation induction. Statistical analyses: Unpaired t test with **(A, C)** and Mann Whitney tests **(F, G, H)** were performed. \*\*P<0.01, \*\*\*\*P < 0.0001.



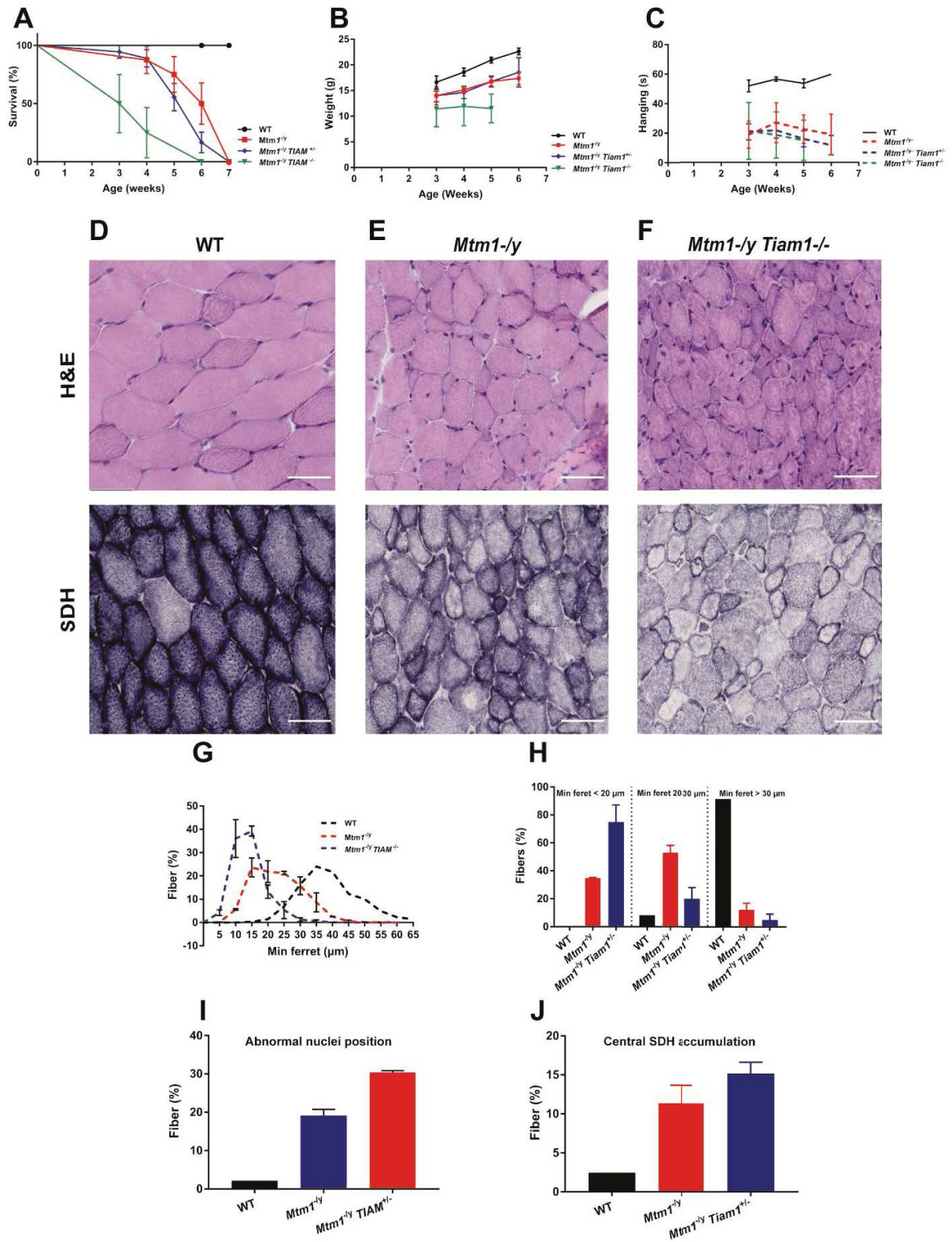
**Fig.5. TIAM1 knock-down & RAC1 inhibition induce a myotubular myopathy-like defects in cells. (A-C)** Untransfected, scramble or *Tiam1* shRNA transfected C2C12 probed for phalloidin (A) or

paxillin (B), showing defects in actin and focal adhesions in *Tiam1* shRNA transfected C2C12 compared to scramble transfected or untransfected C2C12 cells. (C) Merge of paxillin and phalloidin stainings, with a magnification of paxillin localizing at the tips of actin cables in untransfected or scramble transfected C2C12. Paxillin localization at the tips of actin cables is disorganized in sh*Tiam1* transfected C2C12. Scale bars, 14  $\mu\text{m}$ . (D) Quantification of the number of actin cables over nuclei area using phalloidin as an actin marker. (E) Quantification of the number of focal adhesions per cell using paxillin as a FA marker. (F) Adhesion assay: adherent surface of C2C12 cells at 60 min after plating ( $n > 200$  from  $n = 2$  experiments). (G) Migration assay: distance expressed in  $\mu\text{m}$  travelled by C2C12 cells during 24 hours ( $n > 35$  myoblasts from  $n = 1$  replicate). (H, I) Control or RAC1 inhibitor (NSC23766) treated C2C12 cells probed for phalloidin (H) or paxillin (I), showing defects in actin and focal adhesions in C2C12 treated with NSC23766 compared to control. (J) The merge of paxillin and phalloidin staining, with a magnification of paxillin localizing at the tips of actin cables in untreated C2C12, which is disorganized in NSC23766 treated C2C12 cells. Scale bars, 14  $\mu\text{m}$ . (K) Quantification of the number of actin cables over nuclei area. (L) Quantification of the number of focal adhesions per cell ( $n > 36$  myoblasts from  $n = 2$  replicates). (M) Adhesion assay: adherent surface at 60 min after plating ( $n > 300$  myoblasts from  $n = 2$  experiments). (N) Migration assay: distance expressed in  $\mu\text{m}$  travelled during 24 hours ( $n > 27$  myoblasts from  $n = 1$  replicate). Statistical analyses: Nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison (D, E, F), One-way ANOVA with Tukey's post hoc test (G), Unpaired t-test (K, N), and Mann Whitney test (L, M), were performed. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .



**Fig.6. *Tiam1* knock-out induces a myotubular myopathy-like phenotype in *Tiam1*<sup>-/-</sup> mice. (A)** Body weight (g) at 9 weeks (n>7). **(B)** Grip strength (g) at 9 weeks. **(C)** Rotarod at 9 weeks, expressed as time (s) that mice remained on the rotarod before falling (n>7). **(D, E, F)** The distance travelled (cm), the whole arena average speed (cm/s), and the number of rears, respectively, in an open field arena at 8 weeks

(n>7). **(G, H)** Transversal TA muscle sections stained with hematoxylin and eosin (H&E, top) and succinate dehydrogenase (SDH, bottom). Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ . **(I)** Percentage (%) of fibers with TA diameter (expressed as min ferret) below 35  $\mu\text{m}$  or above 35  $\mu\text{m}$ , in WT and *Tiam1*<sup>-/-</sup> mice. **(J)** Percentage (%) of fibers with abnormal (internalized and centralized) nuclei position in TA (n=2). Statistical analyses: One-way ANOVA with Tukey's post hoc test **(A, B, C, E, F)** and Nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison **(D)**. \*P<0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

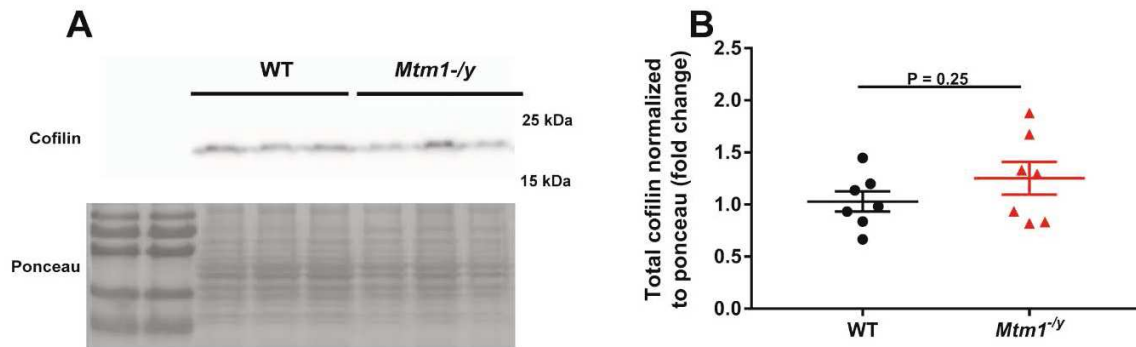




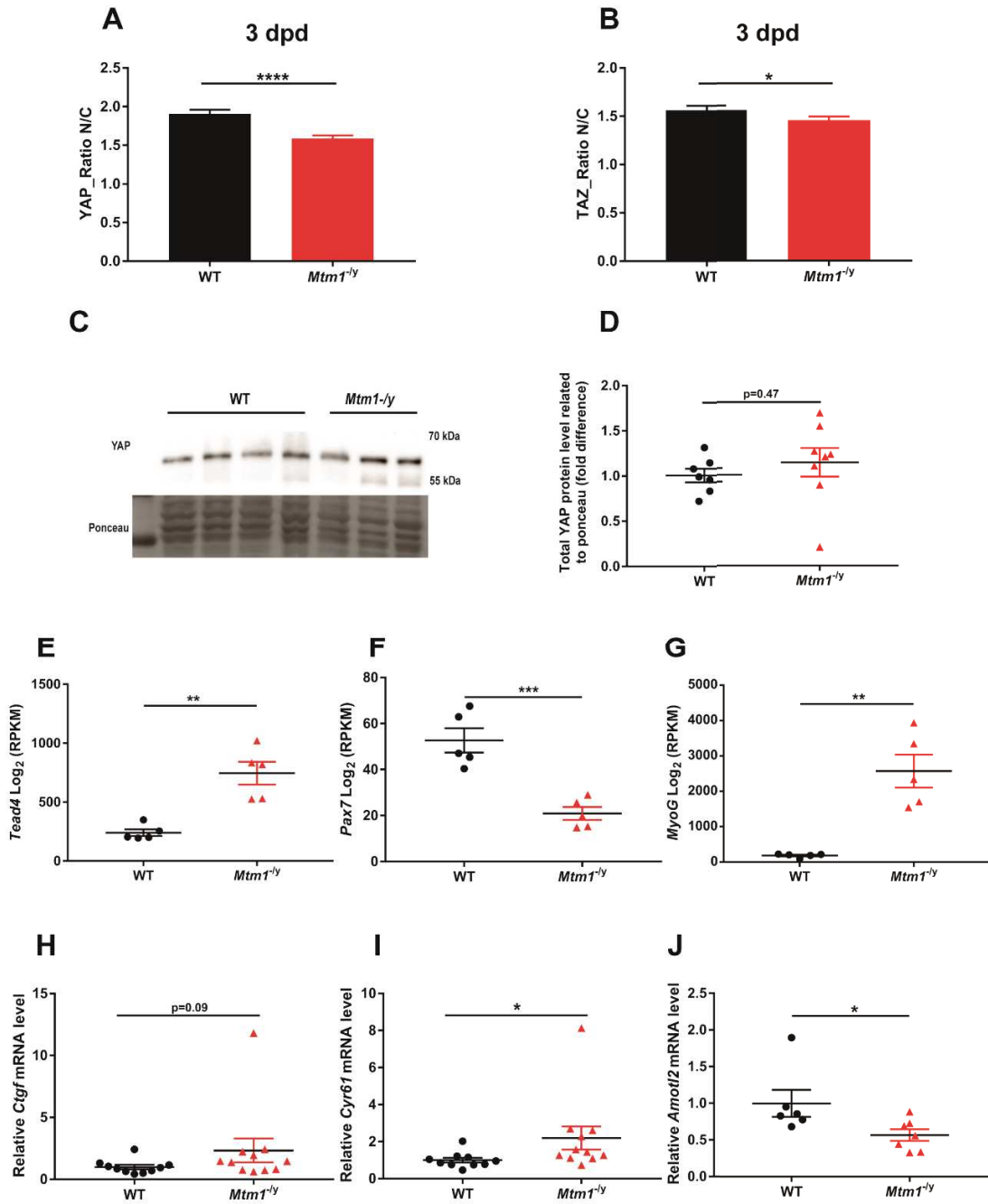
**Fig.7. TIAM1 downregulation decreases the lifespan and worsen the motor and the histological defects of *Mtm1*<sup>-/y</sup> mice.** (A) Lifespan represented as the percentage of survival. (B) Body weight (g) measured at different time points (n>4). (C) Hanging test. Mice were suspended from a cage lid for a maximum of 60 s, and each mouse repeated the test three times (n ≥ 2). (D, E, F) Transversal TA muscle sections stained with hematoxylin and eosin (H&E ; arrows point to mispositionned nuclei) and succinate dehydrogenase (SDH ; arrows point to central SDH accumulation). Scale bars, 50 μm. (G) Diameter of TA fibers grouped into 5μm intervals, in WT (n=1), *Mtm1*<sup>-/y</sup> (n=2) and *Mtm1*<sup>-/y</sup> *Tiam1*<sup>+/-</sup> (n=3). (H) Percentage (%) of fibers with TA diameter (expressed as min ferret) below 20 μm, between 20-30 μm and above 40 μm. (I) Percentage (%) of fibers with abnormal (internalized and centralized) nuclei position in TA from WT (n=1), *Mtm1*<sup>-/y</sup> (n=2) and *Mtm1*<sup>-/y</sup> *Tiam1*<sup>+/-</sup> (n=3). (J) Percentage (%) of fibers with abnormal accumulation of SDH (oxidative material) within the center of the fibers in TA from WT (n=1), *Mtm1*<sup>-/y</sup> (n=2) and *Mtm1*<sup>-/y</sup> *Tiam1*<sup>+/-</sup> (n=3).

**Supplementary Table 1:** Primer list used in RT-qPCR analyses

<b>Protein (<i>gene</i>) name</b>	<b>Primer forward</b>	<b>Primer reverse</b>
RAC1 ( <i>Rac1</i> )	ATGCAGGCCATCAAGTGTG	TAGGAGAGGGGACGCAATCT
TIAM1 ( <i>Tiam1</i> )	GGCTCTCACAGGCTGTCAAT	CATACCGCATTTGCCTCTGC
TIAM2 ( <i>Tiam2</i> )	GACGTTGGAGGATGCGATCT	AACCTCCAAGGGAGAACAGC
RPL27 ( <i>Rpl27</i> ) used as a housekeeping gene	AAGCCGTCATCGTGAAGAACA	CTTGATCTTGGATCGCTTGCC
CTGF ( <i>Ctgf</i> )	AGTGTGCACTGCCAAAGATG	GAAGGACTCACCGCTGC
CYR61 ( <i>Cyr61</i> )	AGAGGCTTCCTGTCTTTGGC	CATTTCTGGCCATGGGCGT
AMOTL2 ( <i>Amotl2</i> )	GGCCGCATAGAAAAGCTGGA	AGGTCCTCATCAGGCTCTC
MYL9 ( <i>Myl9</i> )	AGGCCTCAGGCTTCATCCA	TCGCGGTACATCTCGTCCA
YAP ( <i>Yap</i> )	CCCTCGTTTTGCCATGAACC	GGGAGCCAAGGGTGGGG
TAZ ( <i>Taz</i> )	GCGCTTCAAATGGGGAATTG	CCACAGTGGCAGGATGATGG
TEAD4 ( <i>Tead4</i> )	TGATGCAGAGGGTGTATGGA	GATCAGCTCATTCCGACCAT
TurboGFP	TCCACCACGGAGCTGTAGTA	AACGATCTGGATGGCAGCTT

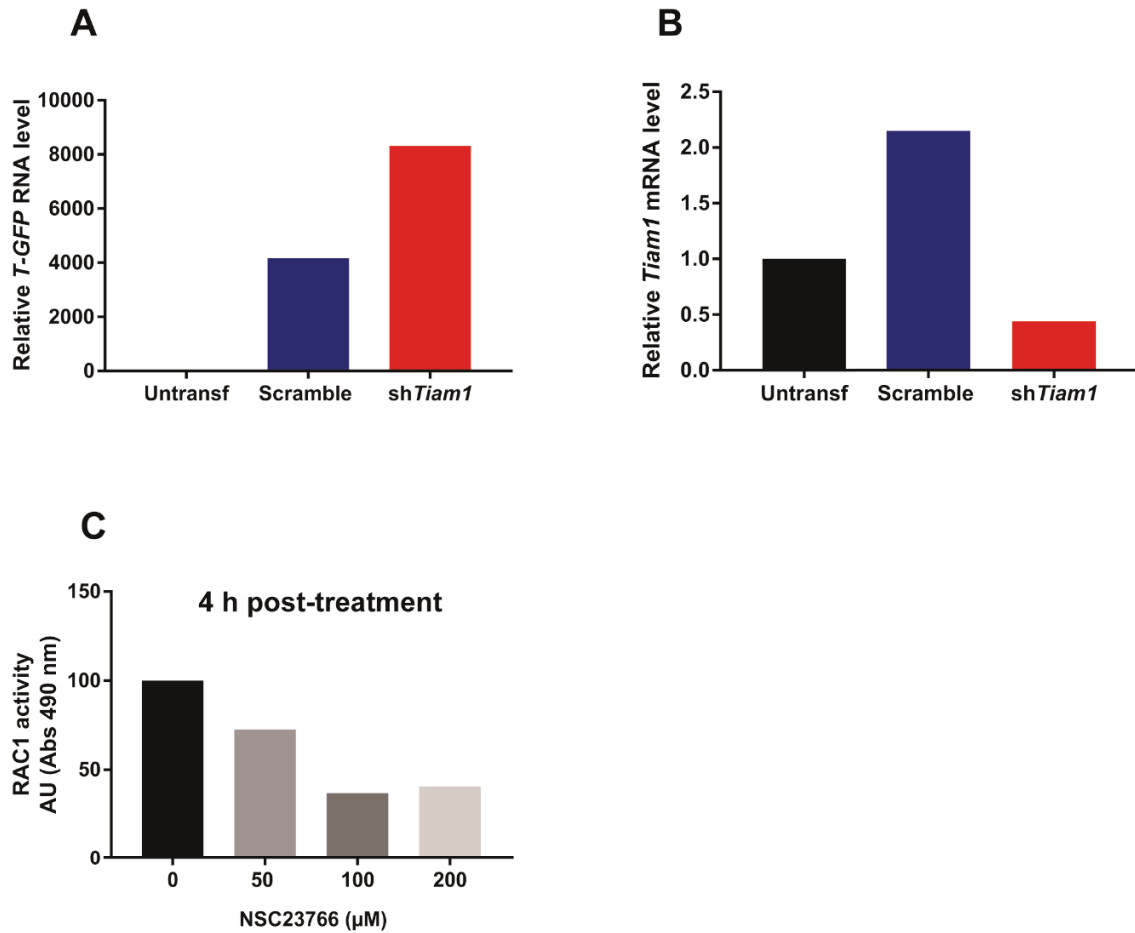


**Supplementary.1. Total cofilin expression is unchanged in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Western blot probed with anti-cofilin antibody in TA muscle from WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice at 7 weeks. (C) Quantification of cofilin normalized to the ponceau of the same gel (n>6). Statistical analyses: Unpaired t test with Welch's correction was performed.

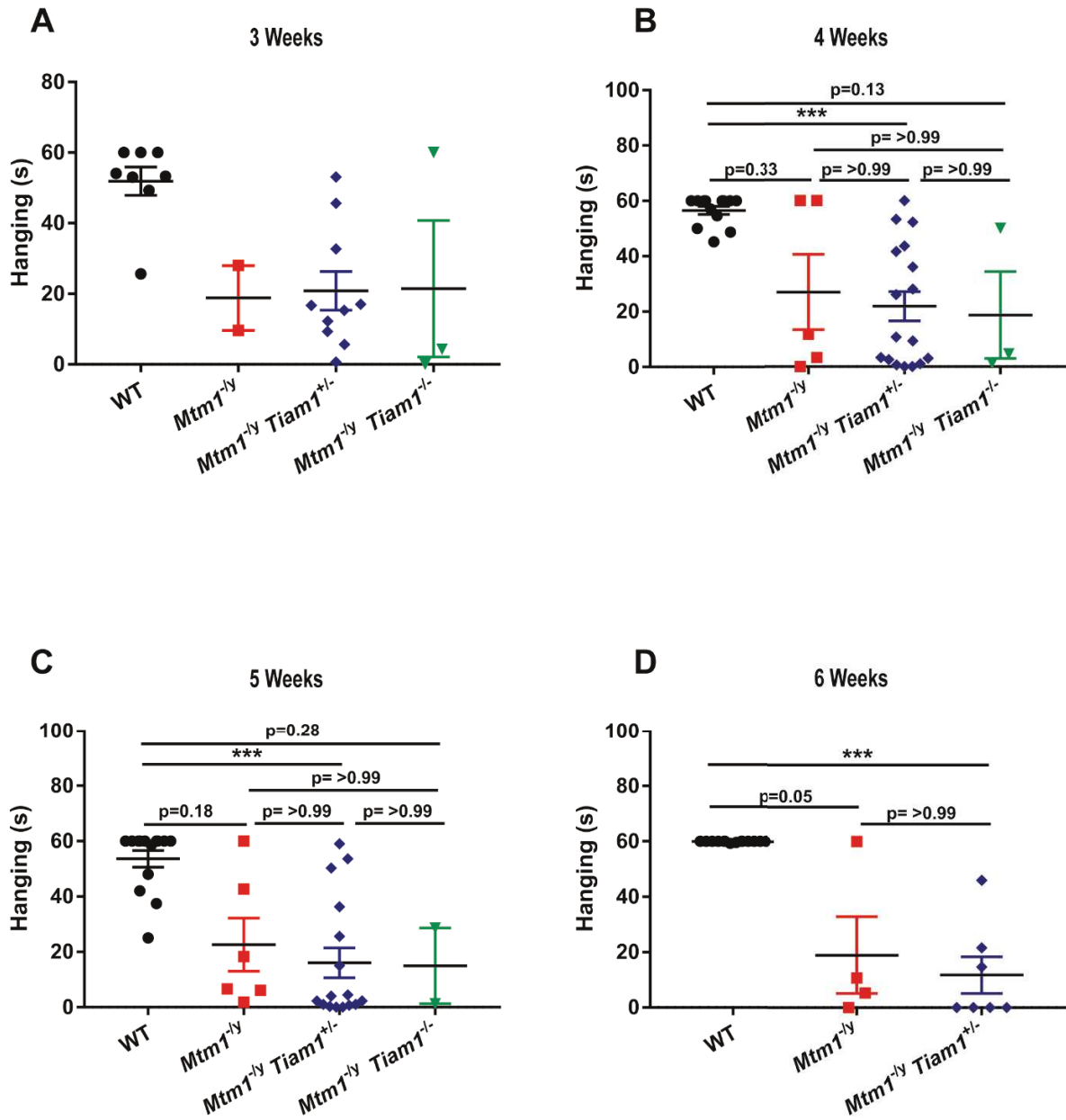


**Supplementary.2. The YAP/TAZ pathway is dysregulated in *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice. (A, B)** Quantification of the ratio of nuclear/cytoplasm localization of YAP and TAZ, respectively, in primary WT

and *Mtm1*<sup>-/-</sup> myotubes, 3 days after differentiation induction (n>63 cells from n=1 replicate). **(C)** Western blot probed with anti-YAP antibody in TA muscle from WT and *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice at 7 weeks. **(D)** Quantification of YAP normalized to the Ponceau of the same gel, n>7. **(E-F)** RNAseq analyses expressed as Log<sub>2</sub> RPKM, of *Tead4*, *Pax7* and *MyoG* (YAP/TAZ target genes) in TA muscles of WT, *Mtm1*<sup>-/-</sup> (n=5). **(H-J)** Quantitative RT-PCR of gene products of *Ctgf*, *Cyr61* and *Amotl2* (YAP/TAZ target genes) in TA muscle at 7 weeks (n>6). Statistical analyses: Mann Whitney test **(A, B, H, I, J)**, Unpaired t test **(F)** and Unpaired t test with Welch's correction **(D, E, G)** were performed \*P<0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001.



**Supplementary.3. TIAM1 knock-down and RAC1 inhibition in C2C12 cells. (A, B)** Quantitative RT-PCR of *Turbo-GFP* and *Tiam1* in untransfected, scramble or shRNA*Tiam1* transfected C2C12 myoblasts (n=1). **(C)** Activity of RAC1 was examined in untreated and SNC23766 treated C2C12 as described in Methods (n=1).



**Supplementary.4. TIAM1 downregulation decreases aggravates the motor defects of *Mtm1*<sup>-/-</sup> mice.** (A-D) Hanging tests. Mice were suspended from a cage lid for a maximum of 60 s, and each mouse repeated the test three times at 3, 4, 5 and 6 weeks of age (n ≥ 2).

# DISCUSSION



# 1. Altération générale de la voie TIAM-RAC1-actine dans la myopathie myotubulaire

Le principal objectif de ma thèse était d'identifier les mécanismes physiopathologiques à l'origine des myopathies centronucléaires. Je me suis principalement intéressée à la myopathie myotubulaire, qui est la forme la plus sévère des CNMs. Cette myopathie est due à des mutations sur le gène *MTM1* codant pour la protéine myotubularine, impliquée dans le remodelage des membranes cellulaires par son activité de phosphatase des phosphoinositides membranaires. Les principales caractéristiques histologiques de la myopathie myotubulaire consistent en un changement de la taille et de la forme des fibres musculaires, qui deviennent plus petites et rondes, avec une internalisation et une centralisation des noyaux qui sont normalement situés à la périphérie des fibres. De plus, les analyses histologiques révèlent également un élargissement de la matrice extracellulaire séparant les fibres musculaires. Toutes ces anomalies sont évocatrices de défauts du cytosquelette et des adhésions focales qui pourraient perturber la mécanotransduction et altérer la fonction musculaire. Bien que quelques études aient été menées dans le but d'élucider les mécanismes physiopathologiques des myopathies centronucléaires, peu d'entre-elles expliquent de manière tangible l'origine de ces défauts typiques qui sont la signature des CNMs.

Durant ma thèse, j'ai d'abord participé, en partie, à l'étude du lien génétique et fonctionnel entre *MTM1* et *BIN1*. Ce travail a permis de mettre en évidence des défauts de trafic de l'intégrine  $\beta 1$ , avec notamment des défauts d'expression et de localisation de cette protéine dans le muscle adulte et dans les cultures primaires de myoblastes de souris *Mtm1*<sup>-y</sup> (Lionello et al., 2019). De plus, ces cellules présentent des défauts d'adhésion, de migration et de fusion en myotubes. Par ailleurs, la surexpression de *BIN1* dans les modèles de souris *Mtm1*<sup>-y</sup> (soit par transgénèse ou par injection des AAV-BIN1) a permis de prolonger la survie des souris *Mtm1*<sup>-y</sup>, de prévenir les défauts phénotypiques liés à la maladie, et de restaurer les niveaux d'expression et la localisation de l'intégrine  $\beta 1$ . Ces résultats indiquent que l'absence de *MTM1* entraîne des défauts de recyclage de l'intégrine  $\beta 1$ , pouvant à son tour altérer la structure des adhésions focales. De plus, *MTM1* et *BIN1* semblent coopérer dans la régulation du recyclage des intégrines. Cette étude a permis de montrer l'implication de *MTM1* dans le trafic des intégrines suggérant des défauts des adhésions focales, pouvant expliquer certaines caractéristiques histologiques de la myopathie myotubulaire.

Afin de mieux comprendre la physiopathologie de la myopathie myotubulaire, la majeure partie de ma thèse a consisté à étudier les voies moléculaires et cellulaires qui sont à l'origine des malformations musculaires telles qu'observées dans les biopsies de patients et des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Les différents travaux de ma thèse m'ont permis d'identifier une dérégulation de la voie TIAM-RAC1-actine, avec des défauts potentiels des adhésions focales et une dérégulation de la mécanotransduction médiée par la voie YAP/TAZ, à la fois dans les muscles adultes et dans les cultures primaires de myoblastes de souris *Mtm1<sup>-y</sup>*.

Nous avons identifié des défauts d'expression de la GEF de RAC1 (TIAM) dans le muscle, durant la phase pré-symptomatique de la maladie (à l'âge de 2 semaines) et lorsque le phénotype devient sévère (à l'âge de 7 semaines). De plus, nous avons pu observer des défauts de l'activité de RAC1 dans les muscles affectés et une altération de la dynamique de l'actine à la fois dans le muscle et dans les cellules de souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Par ailleurs, les adhésions focales ainsi que la voie YAP/TAZ/TEAD4 impliquée dans la médiation de la mécanotransduction en aval de l'actine et des adhésions focales, étaient également dérégulées dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. L'apparition précoce de ces anomalies, dans les cultures primaires et durant la phase pré-symptomatique de la maladie, suggère qu'elles seraient une cause primaire de la myopathie myotubulaire.

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons réduit l'expression de *Tiam1* ou inhibé l'activité de RAC1 dans des cultures de myoblastes C2C12. De façon similaire aux myoblastes primaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>*, la sous-expression de *Tiam1* ou l'inhibition de RAC1 ont entraîné des anomalies du cytosquelette d'actine et des adhésions focales, ainsi que des défauts d'adhésion et de migration des cellules à la matrice extracellulaire. De plus, l'analyse de souris dont le gène *Tiam1* a été inactivé a révélé quelques défauts moteurs et histologiques, similaires à ceux observés dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Ces données *in cellulo* et *in vivo* suggèrent que la réduction de *Tiam1* pourrait être une cause primaire de la myopathie. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons généré des souris double-transgéniques *Mtm1<sup>-y</sup> Tiam1<sup>+/-</sup>* et *Mtm1<sup>-y</sup> Tiam1<sup>-/-</sup>*. L'inhibition partielle ou totale de l'expression de *Tiam1* dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup> Tiam1<sup>+/-</sup>* and *Mtm1<sup>-y</sup> Tiam1<sup>-/-</sup>*, respectivement, a entraîné une aggravation des phénotypes musculaires et histologiques liés à la XLCNM, avec un effet dose-dépendant. Nous avons donc conclu que les défauts de la voie TIAM-RAC1-actine sont une cause primaire de la désorganisation intracellulaire des myofibres dans la myopathie myotubulaire et que *Tiam1* serait un gène modificateur de la maladie.

## **1.1. Interaction de MTM1 et TIAM1 et régulation de RAC1 à la membrane plasmique**

L'investigation des voies moléculaires altérées dans le modèle murin de la myopathie myotubulaire a révélé des défauts d'expression des GEFs TIAM durant la phase pré-symptomatique et durant la phase aiguë de la maladie. La protéine TIAM1 est une GEF impliquée majoritairement dans la régulation de RAC1 (Marei and Malliri, 2017; Marei et al., 2016). L'activité de TIAM1 et de RAC1 nécessite que ces deux protéines soient localisées à la membrane plasmique (Schmidt and Hall, 2002). De précédentes études ont montré que TIAM1 lie avec une forte affinité les phosphoinositides membranaires PtdIns (3,4,5) $P_3$ , PtdIns (4,5) $P_2$  et PtdIns5 $P$ , à travers le domaine PHn de l'extrémité N-terminale, permettant son recrutement à la membrane plasmique et l'activation de la GTPase RAC1 (Fleming et al., 2004; Viaud et al., 2014). De plus, le domaine PHc de l'extrémité C-terminale de TIAM1 permet la liaison du PtdIns3 $P$ , stimulant l'activité d'échange guanylique de TIAM1 (Baumeister et al., 2003). D'autre part, il a été montré que MTM1 est recruté à la membrane plasmique au niveau des protubérances membranaires, suite à l'activation de RAC1 dans les cellules HeLa (Laporte et al., 2002). Ces données de la littérature suggèrent que TIAM1 peut interagir de façon directe avec MTM1 ou de façon indirecte avec les substrats de MTM1 (PtdIns3 $P$  and PtdIns(3,5) $P_2$ ) ou ses produits (PtdIns5 $P$ ). Il est intéressant de noter que nos données préliminaires de double hybride ont révélé une liaison entre MTM1 et le domaine DH des protéines TIAM. Le domaine DH assure la liaison de TIAM1 à RAC1 permettant de l'activer par l'échange guanylique de GDP et GTP. Nos résultats et les données de la littérature suggèrent une interaction entre MTM1 et TIAM1, de façon directe ou indirecte à travers les substrats et/ou produits de MTM1, permettant l'activation de la GTPase RAC1. Cette interaction est perdue en absence de MTM1, entraînant une diminution de l'activité de RAC1 telle qu'elle a été observée dans nos modèles murins de la myopathie myotubulaire.

## **1.2. Altération de la voie TIAM-RAC-actine et défauts des adhésions focales dans la myopathie myotubulaire**

Les résultats de ma thèse ont montré que l'absence de MTM1 dans les myoblastes de souris *Mtm1<sup>-y</sup>*, l'inhibition de l'expression de TIAM1 ou l'inactivation de RAC1 entraînent les mêmes phénotypes cellulaires tels que l'altération des adhésions focales et de l'actine et les défauts d'adhésion et de migration cellulaires. Cela suggère que MTM1, TIAM1 et RAC1 régulent les mêmes voies moléculaires et les mêmes fonctions cellulaires. Les défauts d'adhésion et de migration cellulaires observés dans les myoblastes de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* ou dans les C2C12 transfectés avec le sh*Tiam1* ou traités avec l'inhibiteur de RAC1 résulteraient de la diminution de l'expression de TIAM1 qui entraînerait la réduction de l'activité de RAC1. Il a été récemment montré que la migration des myoblastes est dépendante de TIAM1 (Becsky et al., 2020). De plus, les myoblastes primaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* présentent des défauts de fusion en myotubes, avec une réduction significative de l'index de fusion (Lionello et al., 2019). Ces résultats sont en accord avec les études précédentes ayant montré l'implication de RAC1 dans la fusion des myoblastes, *in vivo* et dans les cultures cellulaires (Meriane et al., 2000; Vasyutina et al., 2009).

L'une des principales fonctions de la GTPase RAC1 consiste à réguler la dynamique de l'actine en favorisant essentiellement la polymérisation de l'actine, via le complexe Arp2/3, ou par l'inhibition de la cofiline, qui est un facteur de dépolymérisation de l'actine. Les résultats de ma thèse ont révélé des défauts majeurs de la dynamique de l'actine dans le muscle adulte et dans les cultures primaires des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Nous avons pu voir une augmentation du ratio de l'actine-G/ actine-F dans le muscle adulte indiquant une diminution de la polymérisation de l'actine. Cette observation a été consolidée dans les cultures primaires de myoblastes *Mtm1<sup>-y</sup>* qui présentaient une diminution importante des « câbles d'actine » périnucléaire. Afin de vérifier le lien entre l'inhibition de RAC1 et les défauts avérés de la dynamique de l'actine, nous avons étudié les principales cibles moléculaires de RAC1, impliquées dans la polymérisation de l'actine. Il a été précédemment montré que TIAM1 interagit avec le complexe Arp2/3 et favorise son interaction avec RAC1 qui, à son tour, permet le recrutement d'Arp2/3 initiant la polymérisation de l'actine (Ten Klooster et al., 2006). Nous avons trouvé que l'expression de ARP3, une des sous-unités majeures du complexe Arp2/3, est significativement diminuée dans les muscles de souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Ces données expliqueraient la diminution de la polymérisation de l'actine observée dans ces souris. Par ailleurs, nos résultats ont mis en évidence une augmentation de la phosphorylation de la cofiline en Ser-3. RAC1 régule l'activité de la cofiline par une cascade de phosphorylations à travers les kinases PAKS et LIMK1/2 (Bamburg and Bernstein, 2010). Lorsque la cofiline est

phosphorylée en Ser-3, elle devient inactive (Moriyama et al., 1996). Ces données indiquent donc que l'augmentation de la phosphorylation de la cofiline, en dépit de l'inhibition de l'activité de RAC1 dans le muscle des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*, résulterait d'un mécanisme compensatoire. En effet, il a été précédemment montré que la phosphorylation de la cofiline en Ser-3 est augmentée suite au désassemblage de l'actine-F lorsque l'expression de RAC1 est abolie dans les kératinocytes de souris. Cette augmentation de la phospho-cofiline Ser-3 est accompagnée d'une diminution de l'expression de la phosphatase de la cofiline, la protéine SSH1 (Liu et al., 2015). De façon similaire, nos résultats ont montré une diminution de l'expression de *Ssh1* et une réduction de la fraction de l'actine-F dans le muscle adulte des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Nos résultats et les données de la littérature suggèrent donc un mécanisme compensatoire dans lequel, suite à la dépolymérisation de l'actine-F induite par la réduction de l'activité de RAC1, l'expression de SSH1 serait réduite entraînant l'inhibition de la cofiline par sa phosphorylation en Ser-3, en vue de limiter la dépolymérisation de l'actine-F. Cependant, ce mécanisme compensatoire ne semble pas suffisant pour prévenir la dépolymérisation de l'actine induite par la réduction de l'activité de RAC1 dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>*.

En plus des défauts de la voie TIAM-RAC1-actine, nos données préliminaires suggèrent également une altération de l'intégrité des adhésions focales. Nous avons pu voir des défauts d'expression de la paxilline, qui est un des composants majeurs des adhésions focales, permettant de connecter les intégrines aux filaments d'actine. Ces anomalies concordent avec les observations précédentes montrant une accumulation intracellulaire de la vinculine et de l'intégrine  $\beta 1$ , due probablement à des défauts de trafic de cette protéine, et une altération de la phosphorylation de la kinase FAK (Lionello et al., 2019). Ces données suggèrent que l'intégrité des adhésions focales est altérée dans les myoblastes primaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Des expériences d'immuno-marquage de la paxilline dans les myoblastes primaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* sont en cours afin de vérifier cette hypothèse. Tous ces résultats suggèrent que les défauts d'adhésion et de migration observés dans les myoblastes *Mtm1<sup>-y</sup>* et dans les C2C12 transfectés avec le sh*Tiam1* ou traités avec l'inhibiteur de RAC1 résulteraient de défauts de l'activité de RAC1 et/ou de l'altération des adhésions focales.

### **1.3. Dérégulation de la mécanotransduction médiée par YAP/TAZ dans la myopathie myotubulaire**

Les résultats de ma thèse ont mis en évidence une dérégulation de la mécanotransduction médiée par les co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ, dans les myoblastes et dans le muscle des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Dans le muscle adulte des souris, nous avons pu voir une augmentation de la fraction phosphorylée de la protéine YAP en Ser-127 indiquant son inactivation et sa rétention cytoplasmique (Zhao et al., 2007). Dans les myoblastes primaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>*, nous avons pu montrer par immunofluorescence que la localisation nucléaire de YAP et TAZ était réduite. Ces données sont par ailleurs consolidées par une dérégulation complète de l'expression des gènes cibles de YAP/TAZ. Néanmoins, l'expression de certains gènes indique potentiellement un mécanisme compensatoire. L'expression de *Tead4*, le facteur de transcription cible de YAP/TAZ, était augmentée dans le muscle adulte des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Le rôle crucial de TEAD4 dans la différenciation des cellules musculaires a récemment été mis en évidence (Joshi et al., 2017). On peut donc imaginer que sa surexpression soit une compensation à la perte de la localisation nucléaire de YAP et TAZ. D'autre part, l'expression d'*Amotl2*, connu pour son rôle dans la rétention cytoplasmique de YAP à travers l'activation de LATS1/2, était diminuée, probablement afin de compenser les défauts de la localisation des protéines YAP et TAZ (Mana-Capelli and McCollum, 2018).

Les différents résultats obtenus durant ma thèse ainsi que les données de la littérature suggèrent MTM1 comme protéine régulatrice de l'activité de RAC1 dépendante de TIAM1. Cette régulation assure le contrôle de la dynamique du cytosquelette d'actine et l'intégrité des adhésions focales qui sont nécessaires à l'adhésion, la migration et la fusion des cellules musculaires. Nos résultats indiquent également que cette voie est complètement altérée dans la myopathie myotubulaire.

## **2. L'altération de la voie TIAM1-RAC comme cause primaire de la myopathie myotubulaire et potentiel mécanisme physiopathologique commun aux autres CNMs**

L'altération de la voie TIAM-RAC1 a été identifiée durant la phase pré-symptomatique de la myopathie myotubulaire, dans les souris âgées de 2 semaines. De plus, les défauts de la dynamique de l'actine et l'altération de la mécanotransduction médiée par YAP/TAZ ont été

observés dans les myoblastes primaires *Mtm1<sup>-y</sup>*. Ces résultats suggèrent que l'altération de la voie TIAM-RAC1-actine pourrait être une cause primaire à la myopathie myotubulaire, et serait à l'origine des principaux phénotypes histologiques et moteurs liés à cette maladie. Les données préliminaires suggérant une altération des adhésions focales dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>* pourraient être à l'origine du changement de la taille et de la forme des myofibres qui deviennent plus petites et rondes avec un élargissement de la matrice extracellulaire entre les fibres musculaires (Lawlor et al., 2016; Lionello et al., 2019; Romero, 2010).

Par ailleurs, les myotubes primaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* présentaient une accumulation anormale des noyaux formant des « sacs de noyaux » avec une réduction de la distance internucléaire. Ces anomalies concordent et expliqueraient les défauts typiques de la localisation des noyaux caractérisant les myopathies centronucléaires (Lawlor et al., 2016; Romero, 2010). De récentes études ont mis en évidence l'implication du cytosquelette d'actine et du complexe Arp2/3 dans le positionnement des noyaux à la périphérie des fibres musculaires, avec l'implication des filaments intermédiaires (Roman and Gomes, 2018; Roman et al., 2017). D'autre part, TIAM2, une autre GEF de RAC1, participe à la stabilisation de l'actine périnucléaire impliquée dans la régulation de l'orientation des noyaux au cours de la polarisation des cellules, et l'inhibition de l'expression de TIAM2 entraîne une réduction de l'expression des gènes cibles de TAZ, indiquant une altération de la mécanotransduction (Woroniuk et al., 2018). Ces données suggèrent que les GEFs TIAM participent au positionnement des noyaux des fibres musculaires par la régulation du cytosquelette d'actine.

D'autre part, BIN1, dont les mutations entraînent également les CNMs, intervient dans le positionnement des noyaux au cours de la formation des fibres musculaires, soit par son interaction avec N-WASP, un autre facteur de nucléation de l'actine, ou par sa liaison directe à l'actine et à nesprine, qui est une protéine de l'enveloppe nucléaire, dans les cellules de mammifères et chez *C. elegans* (D'Alessandro et al., 2015; Falcone et al., 2014). De plus, nous avons montré que la surexpression de BIN1 dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>* permet de rétablir les fonctions motrices et de prévenir l'apparition des anomalies histologiques associées à la myopathie myotubulaire (Lionello et al., 2019). Une autre étude a montré que BIN1 interagit avec TIAM1 et que la surexpression de BIN1 entraîne une augmentation de l'activité de RAC1 induisant des changements de la polymérisation de l'actine au niveau des épines dendritiques (Daudin et al., 2018). Ces données

suggèrent que BIN1 régulerait également la voie TIAM-RAC1-actine, et que, de façon similaire à la myopathie myotubulaire, cette voie serait altérée dans les CNMs associées aux mutations de BIN1.

D'autre part, les données de la littérature ont mis en évidence l'implication de DNM2, une autre protéine mutée dans les CNMs, dans la régulation des réseaux d'actine-F au niveau des lamellipodes, structures indispensables pour la migration cellulaire (Menon et al., 2014). On sait également que la dynamine 1 (DNM1) peut se lier de façon directe à l'actine formant un oligomère permettant de promouvoir la polymérisation de l'actine (Gu et al., 2010). De plus, les fibres musculaires isolées de souris modèles de la myopathie causée par la mutation de DNM2 (*Dnm2<sup>+/R465W</sup>*), présentent des défauts d'organisation et une réduction de la polymérisation de l'actine (González-Jamett et al., 2017). Nos résultats ont mis en évidence une altération de la voie de la mécanotransduction médiée par YAP et TAZ, qui serait la conséquence des défauts avérés de la polymérisation de l'actine dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. L'altération de la mécanotransduction pourrait être à l'origine de la réduction de la force musculaire observée dans les *Mtm1<sup>-y</sup>* et dans les patients atteints de la myopathie myotubulaire. De récents travaux ont montré que la réduction de la force musculaire observée dans les CNMs dues aux mutations de DNM2, ou dans les souris *Dnm2<sup>+/R465W</sup>*, serait due aux défauts des costamères, qui sont des structures riches en actine, assurant la mécanotransduction dans le muscle squelettique (Franck et al., 2019). De plus, les souris *Dnm2<sup>+/R465W</sup>* ont des anomalies de la voie de la mécanotransduction médiée par YAP/TAZ (Franck et al., 2018).

L'ensemble de nos résultats et les données de la littérature suggèrent que la dérégulation de la voie TIAM1-RAC-actine soit dérégulée dans la myopathie myotubulaire et serait potentiellement un mécanisme physiopathologique commun aux autres formes de myopathies centronucléaires.

### **3. TIAM1 comme potentiel gène modificateur dans la myopathie myotubulaire**

Nos données ont montré que la suppression de MTM1, la réduction de l'expression de TIAM1 ou l'inhibition de RAC1 entraînent les mêmes phénotypes cellulaires. *In vivo*, les souris *Tiam1<sup>-/-</sup>* présentent non seulement des défauts moteurs, mais aussi des altérations histologiques



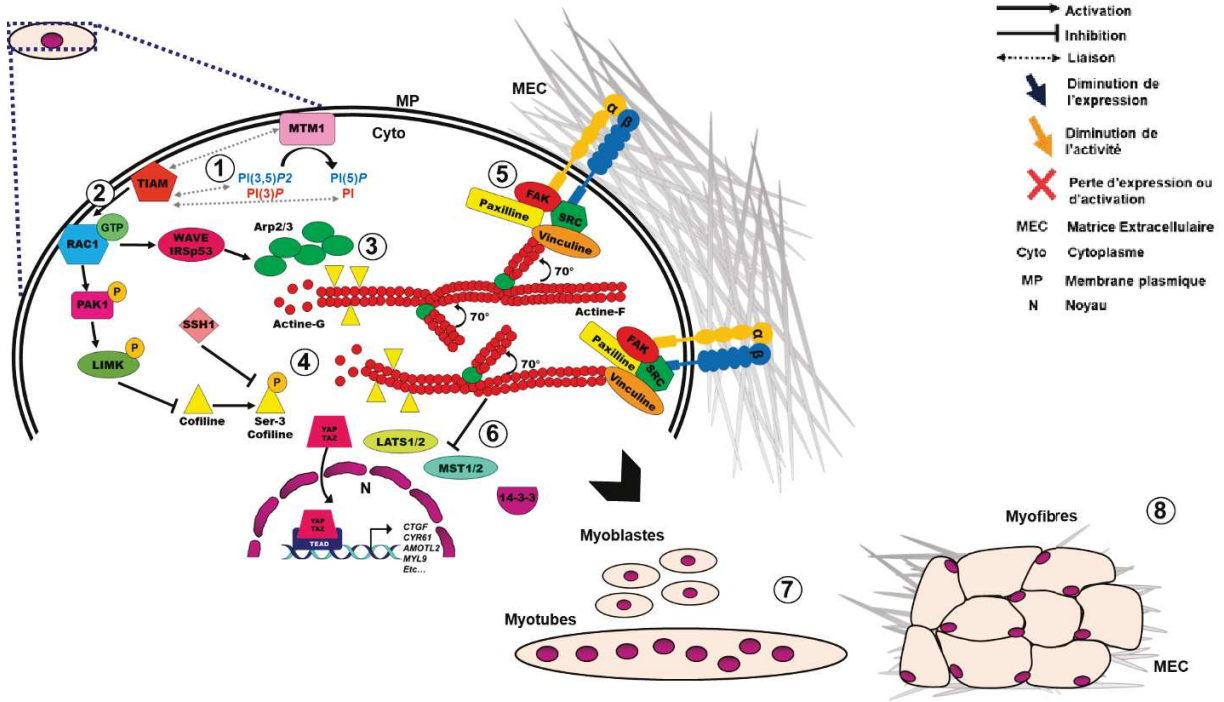
telles que la réduction de la taille des fibres avec des défauts de localisation des noyaux des fibres, similaires à ceux des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Tous ces résultats proposent que la dérégulation de la voie TIAM-RAC1-actine soit une cause primaire de la myopathie myotubulaire. Cette hypothèse est consolidée par les données de transcriptome à partir des biopsies de patients atteints de la myopathie myotubulaire, montrant des dérégulations de l'expression des protéines de liaison au cytosquelette, telles que la cofiline et la sous-unité ARP3 du complexe Arp2/3 (Noguchi et al., 2005). De plus, nous avons montré que l'inactivation partielle ou totale de l'expression de *Tiam1* dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>* aggrave les phénotypes moteurs et histologiques des souris, suggérant *Tiam1* comme gène modificateur de la myopathie myotubulaire.

## 4. Conclusion et perspectives

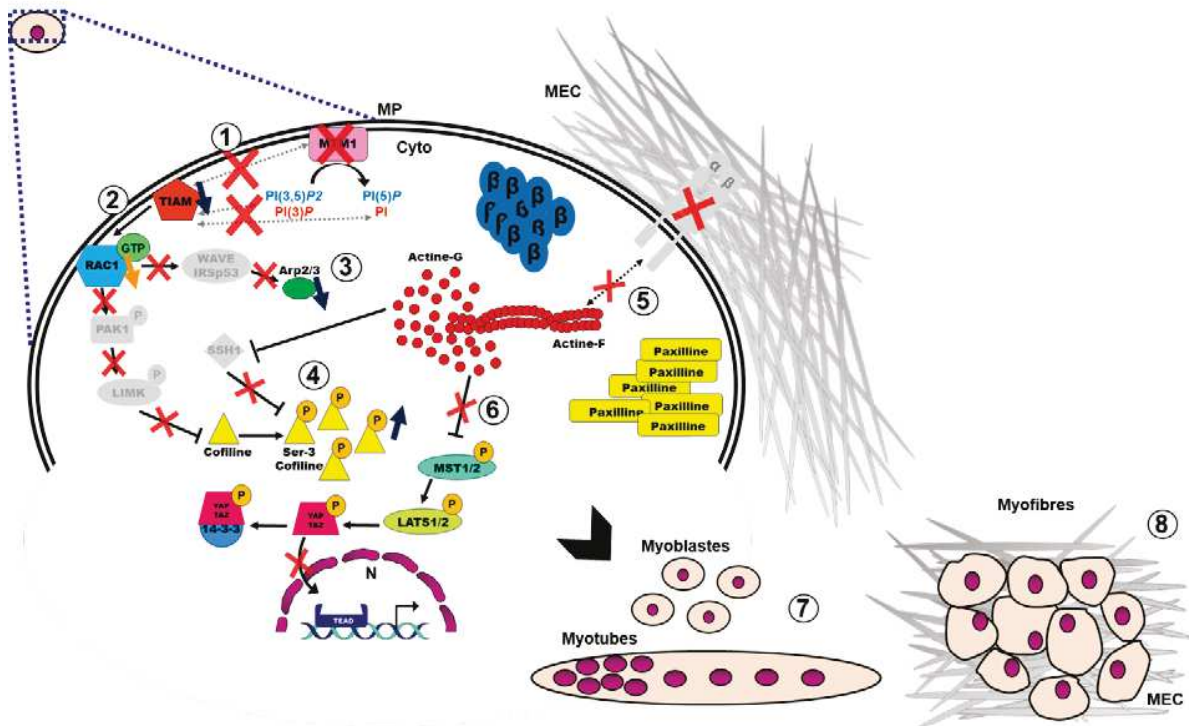
L'objectif de ma thèse était d'identifier les voies moléculaires et cellulaires impliquées dans la physiopathologie de la myopathie myotubulaire. J'ai pu mettre en évidence l'altération de la voie TIAM-RAC1-actine qui serait à l'origine de la désorganisation intracellulaire et de l'altération de la forme et de la structure des fibres musculaires. La caractérisation de modèles cellulaires a montré que la suppression de l'expression de MTM1, la réduction de l'expression de TIAM1 ou l'inhibition de l'activité de RAC1 entraînent une altération des adhésions focales et une dérégulation de la dynamique de l'actine. L'altération des adhésions focales aurait plusieurs conséquences : d'une part, elle entraînerait des défauts de la migration et de la fusion des myoblastes en myotubes, observés dans les myoblastes primaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* (Lionello et al., 2019) et d'autre part, elle causerait la perte de la liaison des myofibres à la matrice extracellulaire, qui serait à l'origine du changement de la forme et la réduction de la taille des myofibres de muscles des patients atteints de la myopathie myotubulaire (Romero, 2010) et des souris *Mtm1<sup>-y</sup>* (Buj-Bello et al., 2002). La dérégulation de la dynamique de l'actine serait à l'origine de la désorganisation intracellulaire, notamment des défauts de localisation des noyaux qui sont internalisés ou localisés dans la partie centrale des myofibres. On a pu voir que les myotubes primaires de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* en différenciation présentent une agrégation anormale des noyaux, formant des « sacs de noyaux », qui pourrait être à l'origine des défauts de la localisation nucléaire typiques de CNMs (Figure 24). Par ailleurs, la suppression de TIAM1 *in vivo* a entraîné des défauts moteurs et histologiques similaires aux CNMs et a aggravé la myopathie myotubulaire dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>*. Nous avons mis en évidence une altération de la voie TIAM-RAC1-actine

qui serait une cause majeure des défauts associés à la myopathie myotubulaire et qui serait potentiellement altérée dans les autres formes de CNMs. Nous avons pu également identifier *Tiam1* comme gène modificateur de la myopathie myotubulaire.

**A**



**B**



**Figure 24. Représentation schématique de la voie TIAM-RAC1-actine dans le muscle sain et dans la myopathie myotubulaire : hypothèse d'un mécanisme cellulaire pathologique.**

(A) La voie TIAM-RAC1-actine dans une cellule musculaire normale (myoblaste). **1)** L'interaction de TIAM1 avec MTM1 ou avec les substrats/ produits de MTM1 stimule son activité de GEF, permettant **2)** d'activer la GTPase RAC1. L'activation de RAC1 permet la régulation du cytosquelette d'actine en activant **3)** la polymérisation de l'actine par la voie WAVE/IRsp53-Arp2/3, permettant la nucléation de nouvelles branches d'actine-F par l'incorporation de nouveaux monomères d'actine-G, et **4)** en favorisant le renouvellement de l'actine par la régulation de la cofiline, qui est soit inhibée par la phosphorylation en Ser-3 par les kinases PAK/LIMK ou activée suite à sa déphosphorylation par la phosphatase SSH1. **5)** L'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire est assurée par les intégrines, qui transmettent les signaux extracellulaires vers la cellule suite à la liaison de l'actine-F aux protéines des adhésions focales, notamment la vinculine et la paxilline. La transmission de ces signaux vers le noyau, mécanisme appelé la mécanotransduction, est médiée, entre autres, par les co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ. À l'état inactif, ces co-activateurs sont phosphorylés par les kinases MST1/2 et LATS1/2, et séquestrés dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 (ou dégradés par le protéasome). **6)** L'actine-F permet l'inhibition des kinases MST1/2 et LATS1/2, permettant la translocation de YAP et TAZ vers le noyau, leur liaison au facteur de transcription TEAD et l'activation de la transcription de leurs gènes cibles. La voie TIAM-RAC-actine favorise l'adhésion des myoblastes à la matrice extracellulaire et leur **7)** migration/fusion au cours de la différenciation des myoblastes en myotubes qui aboutit à **8)** la formation des fibres musculaires de forme hexagonale avec des noyaux situés à la périphérie des fibres musculaires.

(B) L'altération de la voie TIAM-RAC-actine dans la myopathie myotubulaire. Les mutations de *Mtm1* entraînent **1)** la perte de l'expression de la protéine MTM1. En absence de MTM1, l'expression de TIAM1 est diminuée, entraînant **2)** une réduction de l'activité de GTPase de RAC1. La réduction de l'activité de RAC1 entraîne **3)** une réduction de l'expression des sous-unités du complexe Arp2/3 entraînant par conséquence une réduction de la nucléation de nouveaux filaments d'actine-F et une augmentation de la fraction de l'actine-G. En compensation à l'absence de RAC1 et à la dépolymérisation de l'actine, **4)** la phosphatase SSH1 est inhibée et la fraction phosphorylée de cofiline en Ser-3 est augmentée. La réduction de l'actine-F, associée à **5)** une accumulation de l'intégrine  $\beta 1$ , de la vinculine et de la paxilline (altérant potentiellement l'intégrité des adhésions focales) entraînent une **6)** altération de la mécanotransduction, notamment par la diminution de phosphorylation de FAK en Y397 et par la séquestration de YAP/TAZ dans le cytoplasme. L'altération des adhésions focales et du cytosquelette entraîneraient une perte de l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire, qui seraient à la fois à l'origine des **7)** défauts de migration/ fusion de myoblastes en myotubes et les défauts de localisation des noyaux formant des « sacs

de noyaux », à l'origine de **8)** la formation des fibres de petite taille, de forme arrondie, avec noyaux internalisés/centraux, caractéristiques typiques des biopsies musculaires de patients atteints de la myopathie myotubulaire et des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*.

Dans la suite de ce projet, il serait intéressant de vérifier si le rétablissement de la voie TIAM-RAC1-actine serait suffisant pour corriger les défauts cellulaires et histologiques associés à la myopathie myotubulaire. Notre étude a montré que l'activité de RAC1 est diminuée suite à la diminution de l'expression de TIAM1. Comme je l'ai précédemment décrit dans l'introduction (III.3.2), RAC1 oscille entre une forme active et inactive par l'action antagoniste des protéines GEFs et les protéines GAPs, respectivement. Une façon possible de réactiver RAC1 serait d'augmenter l'expression de ses GEFs ou de réduire l'expression de ses GAPs. Contrairement à TIAM1, l'expression de TIAM2 était augmentée dans les muscles de souris *Mtm1<sup>-y</sup>* durant la phase pré-symptomatique (à l'âge de deux semaines) et lorsque la maladie s'aggrave (à l'âge de 7 semaines) (Figure 1, Article 2). TIAM2 est une autre GEF de RAC1, impliquée dans la régulation de l'actine périnucléaire, et dans la mécanotransduction médiée par TAZ (Woroniuk et al., 2018). Si l'on suppose que TIAM1 et TIAM2 régulent les mêmes voies de signalisation dans le muscle squelettique, on pourrait imaginer que l'augmentation de l'expression de TIAM2 soit un mécanisme compensatoire mis en place par les cellules musculaires des souris *Mtm1<sup>-y</sup>* en vue de compenser la réduction de l'expression de TIAM1. Cette augmentation de l'expression de TIAM2 étant insuffisante pour réactiver RAC1, il serait intéressant de sur-exprimer TIAM2 par voie exogène dans les myoblastes *Mtm1<sup>-y</sup>* et voir si les défauts cellulaires associés à la myopathie myotubulaire, décrits dans les résultats de ma thèse et dans (Lionello et al., 2019) sont corrigés. D'autre part, une forme tronquée de la protéine TIAM1 (TIAM1-C1199) a été décrite pour avoir une augmentation de son activité GEF *in vitro* et une forte localisation membranaire *in vivo* (Michiels et al., 1995, 1997). On pourrait supposer que l'expression de ce mutant TIAM1-C1199 dans les myoblastes *Mtm1<sup>-y</sup>* permettrait son recrutement à la membrane plasmique, où il pourra réactiver la GTPase RAC1, qui permettrait de rétablir les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la dynamique de l'actine et des adhésions focales en aval de RAC1 et dérégulées dans la myopathie myotubulaire. Si cette approche s'avère efficace dans les modèles cellulaires, il serait intéressant de vérifier si la surexpression de TIAM1-C1199 dans les souris *Mtm1<sup>-y</sup>* (soit par injection des AAV-TIAM1-C1199 ou pas le croisement des souris *Mtm1<sup>-y</sup>* avec les souris *Tiam1/C1199-CopGFP* exprimant la protéine TIAM1-C1199 (Yu et al., 2013)) permet de rétablir les phénotypes moteurs associés à la XLCNM. Outre l'approche basée sur la surexpression des GEFs, RAC1 pourrait être réactivée par l'inhibition de ses GAPs. ArhGAP15 est l'une des GAPs spécifiques des GTPases RAC (notamment RAC1 et RAC3) (Seoh et al., 2003). Il a été montré

que l'inhibition d'ArhGAP15 dans les souris *ArhGAP15<sup>-/-</sup>* entraîne une hyper-activation de la GTPase RAC1, une augmentation de l'activité des kinases PAK et LIMK1/2 suivie de l'augmentation de la phosphorylation de l'ADF/cofiline (Zamboni et al., 2016, 2018). De ce fait, l'inhibition de l'expression d'ArhGAP15 dans les cellules ou *in vivo*, par le croisement des souris *Mtm1<sup>-y</sup>* avec les souris *ArhGAP15<sup>-/-</sup>* permettrait de rétablir l'activité de RAC1 et la dynamique de l'actine et probablement de corriger les phénotypes histologiques et moteurs des souris *Mtm1<sup>-y</sup>*.

A long terme, il serait intéressant de voir si la dérégulation de la voie TIAM-RAC1-actine est un biomarqueur de la maladie associée aux autres formes de CNMs. Si tel est le cas, cette voie constituerait une cible commune dans le cadre du développement d'une approche thérapeutique applicable aux différentes CNMs.

# **BIBLIOGRAPHIE**



- Abdrabou, A., and Wang, Z. (2018). Post-Translational Modification and Subcellular Distribution of Rac1: An Update. *Cells* 7, 263.
- Abella, J.V.G., Galloni, C., Pernier, J., Barry, D.J., Kjær, S., Carlier, M.-F., and Way, M. (2016). Isoform diversity in the Arp2/3 complex determines actin filament dynamics. *Nat. Cell Biol.* 18, 76–86.
- Abercrombie, M., Heaysman, J.E.M., and Pegrum, S.M. (1971). The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp. Cell Res.* 67, 359–367.
- Abmayr, S.M., and Pavlath, G.K. (2012). Myoblast fusion: Lessons from flies and mice. *Development* 139, 641–656.
- Agrawal, P.B., Pierson, C.R., Joshi, M., Liu, X., Ravenscroft, G., Moghadaszadeh, B., Talabere, T., Viola, M., Swanson, L.C., Haliloğlu, G., et al. (2014). SPEG interacts with myotubularin, and its deficiency causes centronuclear myopathy with dilated cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.*
- Al-Qusairi, L., and Laporte, J. (2011). T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skelet. Muscle* 1, 26.
- Al-Qusairi, L., Prokic, I., Amoasii, L., Kretz, C., Messaddeq, N., Mandel, J.L., and Laporte, J. (2013). Lack of myotubularin (MTM1) leads to muscle hypotrophy through unbalanced regulation of the autophagy and ubiquitin-proteasome pathways. *FASEB J.* 27, 3384–3394.
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* 154, 1047–1059.
- Azzedine, H., Bolino, A., Taïeb, T., Birouk, N., Di Duca, M., Bouhouche, A., Benamou, S., Mrabet, A., Hammadouche, T., Chkili, T., et al. (2003). Mutations in MTMR13, a new pseudophosphatase homologue of MTMR2 and Sbf1, in two families with an autosomal recessive demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease associated with early-onset glaucoma. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1141–1153.
- Beggs, A.H., Bohm, J., Snead, E., Kozlowski, M., Maurer, M., Minor, K., Childers, M.K., Taylor, S.M., Hitte, C., Mickelson, J.R., et al. (2010). MTM1 mutation associated with X-linked myotubular myopathy in Labrador Retrievers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 14697–14702.
- Begley, M.J., and Dixon, J.E. (2005). The structure and regulation of myotubularin phosphatases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 614–620.
- Bernards, A. (2003). GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1603, 47–82.
- Biancalana, V., Scheidecker, S., Miguët, M., Laquerrière, A., Romero, N.B., Stojkovic, T., Abath Neto, O., Mercier, S., Voermans, N., Tanner, L., et al. (2017). Affected female carriers of MTM1 mutations display a wide spectrum of clinical and pathological involvement: delineating diagnostic clues. *Acta Neuropathol.* 134, 889–904.
- Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348, 241–255.

- Bitoun, M., Maugenre, S., Jeannet, P.-Y., Lacène, E., Ferrer, X., Laforêt, P., Martin, J.-J., Laporte, J., Lochmüller, H., Beggs, A.H., et al. (2005). Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* *37*, 1207–1209.
- Böhm, J., Yiş, U., Ortaç, R., Çakmakçı, H., Kurul, S., Dirik, E., and Laporte, J. (2010). Case report of intrafamilial variability in autosomal recessive centronuclear myopathy associated to a novel BIN1 stop mutation. *Orphanet J. Rare Dis.* *5*, 35.
- Böhm, J., Biancalana, V., Malfatti, E., Dondaine, N., Koch, C., Vasli, N., Kress, W., Strittmatter, M., Taratuto, A.L., Gonorazky, H., et al. (2014). Adult-onset autosomal dominant centronuclear myopathy due to BIN1 mutations. *Brain* *137*, 3160–3170.
- Boissier, P., and Huynh-Do, U. (2014). The guanine nucleotide exchange factor Tiam1: A Janus-faced molecule in cellular signaling. *Cell. Signal.* *26*, 483–491.
- Boppart, M.D., and Mahmassani, Z.S. (2019). Integrin signaling: Linking mechanical stimulation to skeletal muscle hypertrophy. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *317*, C629–C641.
- Bos, J., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2009). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Society* *16*, 374–383.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* *349*, 117–127.
- Braga, S., and Al, L.E.T. (1993). Prenatal Diagnosis of X-Linked Centronuclear Myopathy by Linkage Analysis. *33*, 0–3.
- Buj-Bello, A., Laugel, V., Messaddeq, N., Zahreddine, H., Laporte, J., Pellissier, J.F., and Mandel, J.L. (2002). The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15060–15065.
- Campellone, K.G., and Welch, M.D. (2010). A nucleator arms race: Cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 237–251.
- Cassandrini, D., Trovato, R., Rubegni, A., Lenzi, S., Fiorillo, C., Baldacci, J., Minetti, C., Astrea, G., Bruno, C., Santorelli, F.M., et al. (2017). Congenital myopathies: Clinical phenotypes and new diagnostic tools. *Ital. J. Pediatr.* *43*, 1–16.
- Ceyhan-Birsoy, O., Agrawal, P.B., Hidalgo, C., Schmitz-Abe, K., Dechene, E.T., Swanson, L.C., Soemedi, R., Vasli, N., Iannaccone, S.T., Shieh, P.B., et al. (2013). Recessive truncating titin gene, TTN, mutations presenting as centronuclear myopathy. *Neurology*.
- Chiu, C.Y., Leng, S., Martin, K.A., Kim, E., Gorman, S., and Duhl, D.M.J. (1999). Cloning and characterization of T-cell lymphoma invasion and metastasis (TIAM2), a novel guanine nucleotide exchange factor related to TIAM1. *Genomics* *61*, 66–73.
- Claeys, K.G. (2020). Congenital myopathies: an update. *Dev. Med. Child Neurol.* *62*, 297–302.
- Cook, D.R., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2016). Anchorage-Independent Growth and Invasion. *33*, 4021–4035.
- Cowling, B.S., Toussaint, A., Amoasii, L., Koebel, P., Ferry, A., Davignon, L., Nishino, I., Mandel, J.L., and Laporte, J. (2011). Increased expression of wild-type or a centronuclear

myopathy mutant of dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness. *Am. J. Pathol.* *178*, 2224–2235.

Cowling, B.S., Chevremont, T., Prokic, I., Kretz, C., Ferry, A., Coirault, C., Koutsopoulos, O., Laugel, V., Romero, N.B., and Laporte, J. (2014). Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J. Clin. Invest.* *124*, 1350–1363.

Cowling, B.S., Prokic, I., Tasfaout, H., Rabai, A., Humbert, F., Rinaldi, B., Nicot, A.-S., Kretz, C., Friant, S., Roux, A., et al. (2017). Amphiphysin (BIN1) negatively regulates dynamin 2 for normal muscle maturation. *J. Clin. Invest.* *127*, 4477–4487.

Craene JOD, B.D. (2015). Myotubularin MTM1 Involved in Centronuclear Myopathy and its Roles in Human and Yeast Cells. *J. Mol. Genet. Med.* *08*, 8–13.

Cui, X., Vivo, I. De, Slany, R., Miyamoto, A., Firestein, R., and Cleary, M.L. (1998). modulates growth control. *18*, 331–337.

Dasgupta, I., and McCollum, D. (2019). Control of cellular responses to mechanical cues through YAP/TAZ regulation. *J. Biol. Chem.* *294*, 17693–17706.

Deakin, N.O., and Turner, C.E. (2008). Paxillin comes of age. *J. Cell Sci.* *121*, 2435–2444.

Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T., and Snyderman, R. (1989). Rac, a Novel Ras-Related Family of Proteins That Are Botulinum Toxin Substrates. *J. Biol. Chem.* *264*, 16378–16382.

Disanza†, A., Steffen†, A., Hertzog†, M., Frittoli, E., Rottner, K., and Scita, G. (2005). Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *C. Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 955–970.

Dowling, J.J.M.W.L. (2019). X-Linked Myotubular Myopathy Summary Genetic counseling Suggestive Findings. 1–24.

Dowling, J.J., Vreede, A.P., Low, S.E., Gibbs, E.M., Kuwada, J.Y., Bonnemann, C.G., and Feldman, E.L. (2009). Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet.* *5*.

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., et al. (2012). Myotubular myopathy and the neuromuscular junction : a novel therapeutic approach from mouse models. *859*, 852–859.

Du, X., Saido, T.C., Tsubuki, S., Indig, F.E., Williams, M.J., and Ginsberg, M.H. (1995). Calpain cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin  $\beta 3$  subunit. *J. Biol. Chem.* *270*, 26146–26151.

Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* *474*, 179–184.

Falcone, S., Roman, W., Hnia, K., Gache, V., Didier, N., Lainé, J., Auradé, F., Marty, I., Nishino, I., Charlet-Berguerand, N., et al. (2014). N- WASP is required for Amphiphysin-2/ BIN 1-dependent nuclear positioning and triad organization in skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy . *EMBO Mol. Med.* *6*, 1455–1475.

- Fidziasfiska, G. (1994). Aberrant arrested in maturation neuromuscular junctions in centronuclear myopathy. *124*, 83–88.
- Fletcher, D.A., and Mullins, R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* *463*, 485–492.
- Franco, S.J., and Huttenlocher, A. (2005). Regulating cell migration: Calpains make the cut. *J. Cell Sci.* *118*, 3829–3838.
- Frontera, W.R., and Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif. Tissue Int.* *96*, 183–195.
- Gavriilidis, C., Laredj, L., Solinhac, R., Messaddeq, N., Viaud, J., Laporte, J., Sumara, I., and Hnia, K. (2018). The MTM1-UBQLN2-HSP complex mediates degradation of misfolded intermediate filaments in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* *20*, 198–210.
- Gibbs, E.M. (2014). The myopathy-causing mutation DNM2-S619L leads to defective tubulation in vitro and in developing zebrafish. *DMM Dis. Model. Mech.* *7*, 157–161.
- Goedhart, J., and van Unen, J. (2019). Molecular perturbation strategies to examine spatiotemporal features of Rho GEF and Rho GTPase activity in living cells. *Small GTPases* *10*, 178–186.
- Goicoechea, S.M., Awadia, S., and Garcia-Mata, R. (2014). I’m coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adhes. Migr.* *8*, 535–549.
- Goto, A. (2011). Phosphorylation of STEF / Tiam2 by protein kinase A is critical for Rac1 activation and neurite outgrowth in dibutyryl cAMP – treated PC12D cells.
- Haase, K., Al-Rekabi, Z., and Pelling, A.E. (2014). Mechanical Cues Direct Focal Adhesion Dynamics. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier Inc.), pp. 103–134.
- Habets, G.G.M. (1994). Identification of an Invasion-Inducing Tiam-7 , That Encodes a Protein with Homology to GDP-GTP Exchangers for Rho-Like Proteins. *77*, 537–549.
- Hagel, M., George, E.L., Kim, A., Tamimi, R., Opitz, S.L., Turner, C.E., Imamoto, A., and Thomas, S.M. (2002). The Adaptor Protein Paxillin Is Essential for Normal Development in the Mouse and Is a Critical Transducer of Fibronectin Signaling. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 901–915.
- Halder, G., Dupont, S., and Piccolo, S. (2012). Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 591–600.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: New insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 690–701.
- Herman, G.E., Finegold, M., Zhao, W., De Gouyon, B., and Metzzenberg, A. (1999). Medical complications in long-term survivors with X-linked myotubular myopathy. *J. Pediatr.* *134*, 206–214.
- Hnia, K., Tronchère, H., Tomczak, K.K., Amoasii, L., Schultz, P., Beggs, A.H., Payrastre, B., Mandel, J.L., and Laporte, J. (2011). Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* *121*, 70–85.

- Hodge, R.G., and Ridley, A.J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 496–510.
- Hohendahl, A., Roux, A., and Galli, V. (2016). Structural insights into the centronuclear myopathy-associated functions of BIN1 and dynamin 2. *J. Struct. Biol.* *196*, 37–47.
- Hoshino, M., Sone, M., Fukata, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Nabeshima, Y., and Hama, C. (1999). Identification of the *stef* Gene That Encodes a Novel Guanine Nucleotide Exchange Factor Specific for Rac1. *J. Biol. Chem.* *274*, 17837–17844.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 247–269.
- Jones, D.R., Bultsma, Y., Keune, W.J., Halstead, J.R., Elouarrat, D., Mohammed, S., Heck, A.J., D’Santos, C.S.S., and Divecha, N. (2006). Nuclear PtdIns5P as a Transducer of Stress Signaling: An In Vivo Role for PIP4Kbeta. *Mol. Cell* *23*, 685–695.
- Joshi, S., Davidson, G., Le Gras, S., Watanabe, S., Braun, T., Mengus, G., and Davidson, I. (2017). TEAD transcription factors are required for normal primary myoblast differentiation in vitro and muscle regeneration in vivo.
- Jungbluth, H., and Gautel, M. (2014). Pathogenic mechanisms in centronuclear myopathies. *Front. Aging Neurosci.* *6*, 1–11.
- Jungbluth, H., and Voermans, N.C. (2016). Congenital myopathies: Not only a paediatric topic. *Curr. Opin. Neurol.* *29*, 642–650.
- Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C., and Laporte, J. (2008). Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J. Rare Dis.* *3*, 26.
- Jungbluth, H., Ochala, J., Treves, S., and Gautel, M. (2017). Current and future therapeutic approaches to the congenital myopathies. *Semin. Cell Dev. Biol.* *64*, 191–200.
- Kanai, F., Marignani, P.A., Sarbassova, D., Yagi, R., Hall, R.A., Donowitz, M., Hisaminato, A., Fujiwara, T., Ito, Y., Cantley, L.C., et al. (2000). TAZ: A novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J.* *19*, 6778–6791.
- Kanellos, G., and Frame, M.C. (2016). Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. *J. Cell Sci.* *129*, 3211–3218.
- Kechagia, J.Z., Ivaska, J., and Roca-Cusachs, P. (2019). Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 457–473.
- Ketel, K., Krauss, M., Nicot, A.-S., Puchkov, D., Wieffer, M., Müller, R., Subramanian, D., Schultz, C., Laporte, J., and Haucke, V. (2016). A phosphoinositide conversion mechanism for exit from endosomes. *Nature* *529*, 408–412.
- Ten Klooster, J.P., Evers, E.E., Janssen, L., Machesky, L.M., Michiels, F., Hordijk, P., and Collard, J.G. (2006). Interaction between Tiam1 and the Arp2/3 complex links activation of Rac to actin polymerization. *Biochem. J.* *397*, 39–45.
- Kuo, J.C. (2014). Focal adhesions function as a mechanosensor. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier Inc.), pp. 55–73.

- Kurita, S., Watanabe, Y., Gunji, E., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2008). Molecular dissection of the mechanisms of substrate recognition and F-actin-mediated activation of cofilin-phosphatase slingshot-1. *J. Biol. Chem.* 283, 32542–32552.
- Laporte, J., Hu, L.J., Kretz, C., Mandel, J.L., Kioschis, P., Coy, J.F., Klauck, S.M., Poustka, A., and Dahl, N. (1996). A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.* 13, 175–182.
- Laporte, J., Blondeau, F., Buj-bello, A., Tentler, D., Kretz, C., Dahl, N., Mandel, J., Génétique, I. De, Biologie, D., Ulp, C.I., et al. (1998). Characterization of the myotubularin dual specificity phosphatase gene family from yeast to human. 7, 1703–1712.
- Laporte, J., Blondeau, F., Gansmuller, A., Lutz, Y., Vonesch, J.L., and Mandel, J.L. (2002). The PtdIns3P phosphate myotubularin is a cytoplasmic protein that also localizes to Rac1-inducible plasma membrane ruffles. *J. Cell Sci.* 115, 3105–3117.
- Laporte, J., Bedez, F., Bolino, A., and Mandel, J.-L. (2003). Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases. *Hum. Mol. Genet.* 12 *Spec No*, R285-92.
- Lawlor, M.W., Armstrong, D., Viola, M.G., Widrick, J.J., Meng, H., Grange, R.W., Childers, M.K., Hsu, C.P., O’Callaghan, M., Pierson, C.R., et al. (2013). Enzyme replacement therapy rescues weakness and improves muscle pathology in mice with X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mol. Genet.* 22, 1525–1538.
- Lecompte, O., Poch, O., and Laporte, J. (2008). PtdIns5P regulation through evolution: roles in membrane trafficking? *Trends Biochem. Sci.* 33, 453–460.
- Lee, S.H., and Dominguez, R. (2010). Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol. Cells* 29, 311–325.
- Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O.A., Ochoa, G.C., Farsad, K., Wenk, M.R., and De Camilli, P. (2002). Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* (80-. ). 297, 1193–1196.
- Lorenzo, O., Urbe, S., and Clague, M.J. (2006). Systematic analysis of myotubularins: heteromeric interactions, subcellular localisation and endosomelated functions. *J. Cell Sci.* 119, 2953–2959.
- Madaule, P., and Axel, R. (1985). A novel ras-related gene family. *Cell* 41, 31–40.
- Mana-Capelli, S., and McCollum, D. (2018). Angiotensins stimulate LATS kinase autophosphorylation and act as scaffolds that promote Hippo signaling. *J. Biol. Chem.* 293, 18230–18241.
- Mana-Capelli, S., Paramasivam, M., Dutta, S., and McCollum, D. (2014). Angiotensins link F-actin architecture to Hippo pathway signaling. *Mol. Biol. Cell* 25, 1686–1697.
- Maninová, M., and Vomastek, T. (2016). Dorsal stress fibers, transverse actin arcs, and perinuclear actin fibers form an interconnected network that induces nuclear movement in polarizing fibroblasts. *FEBS J.* 283, 3676–3693.
- Marat, A.L., and Haucke, V. (2016). Phosphatidylinositol 3-phosphates—at the interface between

cell signalling and membrane traffic. *EMBO J.* *35*, 561–579.

Marei, H., and Malliri, A. (2017). GEFs: Dual regulation of Rac1 signaling. *Small GTPases* *8*, 90–99.

Martino, F., Perestrelo, A.R., Vinarský, V., Pagliari, S., and Forte, G. (2018). Cellular mechanotransduction: From tension to function. *Front. Physiol.* *9*, 1–21.

Mayer, U. (2003). Integrins: Redundant or important players in skeletal muscle? *J. Biol. Chem.* *278*, 14587–14590.

Meng, Z., Moroishi, T., and Guan, K.L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* *30*, 1–17.

Mertens, A.E., Roovers, R.C., and Collard, J.G. (2003). Regulation of Tiam1-Rac signalling. *FEBS Lett.* *546*, 11–16.

Messaddeq, N., Kretz, C., Al-qusairi, L., Weiss, N., Toussaint, A., Sanoudou, D., Beggs, A.H., Allard, B., Mandel, J., Laporte, J., et al. (2009). T-tubule disorganization and defective. *106*.

Michiels, F. (1995). A role for Rae in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *375*, 338–340.

Michiels, F., Stam, J.C., Hordijk, P.L., Kammen, R.A. van der, Stalle, L.R.-V., Feltkamp, C.A., and Collard, J.G. (1997). Regulated Membrane Localization of Tiam1, Mediated by the NH2-terminal Pleckstrin Homology Domain, Is Required for Rac-dependent Membrane Ruffling and C-Jun NH2-terminal Kinase Activation. *J. Cell Biol.* *137*, 387–398.

Milner, D.J., Mavroidis, M., Weisleder, N., and Capetanaki, Y. (2000). Desmin Cytoskeleton Linked to Muscle Mitochondrial Distribution and Respiratory Function. *150*, 1283–1297.

Minard, M.E., Kim, L.-S., Price, J.E., and Gallick, G.E. (2004). The Role of the Guanine Nucleotide Exchange Factor Tiam1 in Cellular Migration, Invasion, Adhesion and Tumor Progression. *Breast Cancer Res. Treat.* *84*, 21–32.

Mizuno, K. (2013). Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell. Signal.* *25*, 457–469.

Moriyama, K., Iida, K., and Yahara, I. (1996). Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes to Cells* *1*, 73–86.

Mukund, K., and Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* *12*, 1–46.

Nicot, A.S., Toussaint, A., Tosch, V., Kretz, C., Wallgren-Pettersson, C., Iwarsson, E., Kingston, H., Garnier, J.M., Biancalana, V., Oldfors, A., et al. (2007). Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* *39*, 1134–1139.

Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: Pivotal molecules in cellular signalling. *Cell. Signal.* *11*, 545–554.

Ono, S. (2007). Mechanism of Depolymerization and Severing of Actin Filaments and Its

Significance in Cytoskeletal Dynamics. In *International Review of Cytology*, pp. 1–82.

Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* *443*, 651–657.

Pollard, T.D. (2017). Actin and Actin-Binding Proteins. In *Cell Biology*, (Elsevier), pp. 575–591.

Praefcke, G.J.K., and McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 133–147.

Prokic, I., Cowling, B.S., and Laporte, J. (2014). Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J. Mol. Med.* *92*, 453–463.

Quach, N.L., and Rando, T.A. (2006). Focal adhesion kinase is essential for costamereogenesis in cultured skeletal muscle cells. *293*, 38–52.

Ravenscroft, G., Bryson-Richardson, R.J., Nowak, K.J., and Laing, N.G. (2018). Recent advances in understanding congenital myopathies [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* *7*.

Ribeiro, I., Yuan, L., Tanentzapf, G., Dowling, J.J., and Kiger, A. (2011). Phosphoinositide Regulation of Integrin Trafficking Required for Muscle Attachment and Maintenance. *PLoS Genet.* *7*, e1001295.

Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* *70*, 401–410.

Robinson R.C., Turbedsky K., Kaiser D.A., Marchand J., Higgs H.N., Choe S., and Pollard T.D. (2001). Crystal Structure of Arp2 / 3 Complex. *Science* (80-. ). *294*, 1679–1685.

Rochlin, K., Yu, S., Roy, S., and Baylies, M.K. (2010). Myoblast fusion: When it takes more to make one. *Dev. Biol.* *341*, 66–83.

Romero, N.B. (2010). Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul. Disord.* *20*, 223–228.

Romero, N.B., and Bitoun, M. (2011). Centronuclear Myopathies. *Semin. Pediatr. Neurol.* *18*, 250–256.

Rooney, C., White, G., Nazgiewicz, A., Woodcock, S.A., Anderson, K.I., Ballestrom, C., and Malliri, A. (2010). The Rac activator STEF (Tiam2) regulates cell migration by microtubule-mediated focal adhesion disassembly. *EMBO Rep.* *11*, 292–298.

Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: Turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 167–180.

Royer, B., Hnia, K., Gavriilidis, C., Tronchère, H., Tosch, V., and Laporte, J. (2013). The myotubularin–amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO Rep.* *14*, 907–915.

Schaller, M.D. (2001). Paxillin: A focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* *20*, 6459–6472.

Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: Turning on the switch. *Genes Dev.* *16*, 1587–1609.



- Schwander, M., Leu, M., Stumm, M., Dorchies, O.M., Ruegg, U.T., Schittny, J., and Müller, U. (2003). B1 Integrins Regulate Myoblast Fusion and Sarcomere Assembly. *Dev. Cell* 4, 673–685.
- Shichiji, M., Fardeau, M., Hogrel, J., Osawa, M., Laporte, J., and Romero, N.B. (2013). Extensive morphological and immunohistochemical characterization in myotubular myopathy.
- Snyder, J.T., Rossman, K.L., Baumeister, M.A., Pruitt, W.M., Siderovski, D.P., Der, C.J., Lemmon, M.A., and Sondek, J. (2001). Quantitative Analysis of the Effect of Phosphoinositide Interactions on the Function of Dbl Family Proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 45868–45875.
- Spiro, A.J., Shy, G.M., and Gonatas, N.K. (1966). Myotubular Myopathy: Persistence of Fetal Muscle in an Adolescent Boy. *Arch. Neurol.* 14, 1–14.
- Sudol, M. (1995). Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain.
- Sun, C., De Mello, V., Mohamed, A., Ortuste Quiroga, H.P., Garcia-Munoz, A., Al Bloshi, A., Tremblay, A.M., von Kriegsheim, A., Collie-Duguid, E., Vargesson, N., et al. (2017). Common and Distinctive Functions of the Hippo Effectors Taz and Yap in Skeletal Muscle Stem Cell Function. *Stem Cells* 35, 1958–1972.
- Tasfaout, H., Lionello, V.M., Kretz, C., Koebel, P., Messaddeq, N., Bitz, D., Laporte, J., and Cowling, B.S. (2018). Single Intramuscular Injection of AAV-shRNA Reduces DNM2 and Prevents Myotubular Myopathy in Mice. *Mol. Ther.* 26, 1082–1092.
- Taylor, G.S., Maehama, T., and Dixon, J.E. (2000). Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8910–8915.
- Thomas, N.S.T., Williams, H., Cole, G., Roberts, K., Clarke, A., Braga, S., Gerber, A., Meier, C., Moser, H., Harper, P.S., et al. (1990). X linked neonatal centronuclear / myotubular myopathy : evidence for linkage to Xq28 DNA marker loci. 284–287.
- Toma-Fukai, and Shimizu (2019). Structural Insights into the Regulation Mechanism of Small GTPases by GEFs. *Molecules* 24, 3308.
- Tosch, V., Rohde, H.M., Tronchère, H., Zanoteli, E., Monroy, N., Kretz, C., Dondaine, N., Payrastre, B., Mandel, J.-L., and Laporte, J. (2006). A novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P2 phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy. *Hum. Mol. Genet.* 15, 3098–3106.
- Tronchère, H., Laporte, J., Pendaries, C., Chaussade, C., Liaubet, L., Pirola, L., Mandel, J., and Payrastre, B. (2004). Production of Phosphatidylinositol 5-Phosphate by the Phosphoinositide 3-Phosphatase Myotubularin in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 7304–7312.
- Trovato, F.M. (2016). Morphological and functional aspects of human skeletal muscle. *J. Funct. Morphol. Kinesiol.* 1, 289–302.
- Tsujita, K., Itoh, T., Ijuin, T., Yamamoto, A., Shisheva, A., Laporte, J., and Takenawa, T. (2004). Myotubularin Regulates the Function of the Late Endosome through the GRAM Domain-Phosphatidylinositol 3, 5-Bisphosphate Interaction \*. *J. Biol. Chem.* 279, 13817–13824.

- Vanni, C., Mancini, P., Gao, Y., Ottaviano, C., Guo, F., Salani, B., Torrisi, M.R., Zheng, Y., and Eva, A. (2002). Regulation of proto-Dbl by intracellular membrane targeting and protein stability. *J. Biol. Chem.* *277*, 19745–19753.
- Velichkova, M., Juan, J., Kadandale, P., Jean, S., Ribeiro, I., Raman, V., Stefan, C., and Kiger, A.A. (2010). Drosophila Mtm and class II PI3K coregulate a PI(3)P pool with cortical and endolysosomal functions. *J. Cell Biol.* *190*, 407–425.
- Van Der Ven, P.F.M., Jap, P.H.K., Ter Laak, H.J., Nonaka, I., Barth, P.G., Sengers, R.C.A., Stadhouders, A.M., and Ramaekers, F.C.S. (1995). Immunophenotyping of congenital myopathies: disorganization of sarcomeric, cytoskeletal and extracellular matrix proteins. *J. Neurol. Sci.* *129*, 199–213.
- Viaud, J., Boal, F., Tronchère, H., Gaits-Iacovoni, F., and Payrastre, B. (2014). Phosphatidylinositol 5-phosphate: A nuclear stress lipid and a tuner of membranes and cytoskeleton dynamics. *BioEssays* *36*, 260–272.
- Wada, K.I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., and Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* *138*, 3907–3914.
- Wang, S., Watanabe, T., Matsuzawa, K., Katsumi, A., Kakeno, M., Matsui, T., Ye, F., Sato, K., Murase, K., Sugiyama, I., et al. (2012). Tiam1 interaction with the PAR complex promotes talin-mediated Rac1 activation during polarized cell migration. *J. Cell Biol.* *199*, 331–345.
- Watt, K.I., Judson, R., Medlow, P., Reid, K., Kurth, T.B., Burniston, J.G., Ratkevicius, A., Bari, C. De, and Wackerhage, H. (2010). Yap is a novel regulator of C2C12 myogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *393*, 619–624.
- Watt, K.I., Turner, B.J., Hagg, A., Zhang, X., Davey, J.R., Qian, H., Beyer, C., Winbanks, C.E., Harvey, K.F., and Gregorevic, P. (2015). The Hippo pathway effector YAP is a critical regulator of skeletal muscle fibre size. *Nat. Commun.* *6*.
- Webb, D.J., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells – over and over and over again. *Nat. Cell Biol.* *4*, E97–E100.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005a). The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* *118*, 843–846.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005b). The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* *118*, 843–846.
- Wilmshurst, J.M., Lillis, S., Zhou, H., Pillay, K., Henderson, H., Kress, W., Müller, C.R., Nondo, A., Cloke, V., Cullup, T., et al. (2010). RYR1 mutations are a common cause of congenital myopathies with central nuclei. *Ann. Neurol.*
- Wilson, O.J., Bradley, H., Shaw, C.S., and Wagenmakers, A.J.M. (2014). Paxillin and focal adhesion kinase colocalise in human skeletal muscle and its associated microvasculature. *Histochem. Cell Biol.* *142*, 245–256.
- Xu, Z., Gakhar, L., Bain, F.E., Spies, M., and Fuentes, E.J. (2017). The Tiam1 guanine nucleotide exchange factor is auto-inhibited by its pleckstrin homology coiled-coil extension domain. *J. Biol. Chem.* *292*, 17777–17793.

Yang, W.J., Zhong, J., Yu, J.G., Zhao, F., and Xiang, Y. (2017). The structure and functions of paxillin and its roles in neovascularization. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* *21*, 1768–1773.

Zhao, B., Li, L., Lei, Q., and Guan, K.L. (2010). The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev.* *24*, 862–874.

## Identification des voies moléculaires et cellulaires altérées dans la myopathie centronucléaire liée au chromosome X (XLCNM)

Les myopathies centronucléaires (CNM) sont des maladies musculaires très invalidantes, caractérisées par une faiblesse musculaire généralisée et par une altération de l'organisation intracellulaire des myofibres, avec une centralisation des noyaux. La CNM liée à l'X (XLCNM), causée par les mutations du gène *MTM1* codant pour la myotubularine, est la forme la plus sévère. À ce jour, les mécanismes physiopathologiques de la XLCNM sont très peu élucidés. Durant ma thèse, j'ai étudié les voies moléculaires et cellulaires à l'origine de la XLCNM dans les modèles cellulaires et animaux. J'ai pu identifier une altération de la voie TIAM-RAC1-actine, avec notamment une réduction des niveaux de TIAM1, un facteur d'échange de nucléotide guanylique de la GTPase RAC1, et de l'activité de RAC1 dans les muscles des souris *Mtm1<sup>-ly</sup>*, un modèle fidèle de la XLCNM. La dynamique de l'actine était altérée, avec une augmentation du ratio de l'actine G/F dans les muscles, et une réduction du nombre de câbles d'actine périnucléaire dans les myoblastes des souris *Mtm1<sup>-ly</sup>*. De plus, j'ai révélé des défauts d'expression de la paxilline, indiquant des défauts des adhésions focales, d'une altération de la mécanotransduction médiée par YAP/TAZ, additionnées de défauts de localisation des noyaux de myotubes *Mtm1<sup>-ly</sup>* en différenciation. Par ailleurs, la réduction de l'expression de TIAM1 ou l'inhibition de RAC1 reproduisent les phénotypes cellulaires associés à la XLCNM. La suppression de *TIAM1* dans les souris reproduit des défauts moteurs associés à la XLCNM et aggrave les phénotypes moteurs et histologiques des souris *Mtm1<sup>-ly</sup>*. Les résultats de ma thèse suggèrent l'altération de la voie TIAM-RAC1-actine comme cause primaire de la XLCNM et l'altération de cette voie pourrait représenter un mécanisme physiopathologique commun aux autres CNMs.

Mots-clés: RAC1, GTPase, myopathies centronucléaires, actine, TIAM

Centronuclear myopathies (CNM) are highly disabling muscle diseases, characterized by generalized muscle weakness and altered myofibres intracellular organization, including nuclei centralization. X-linked CNM (XLCNM), caused by mutations in the *MTM1* gene coding for myotubularin, is the most severe form. To date, the pathophysiological mechanisms of XLCNM are poorly elucidated. During my thesis, I studied the molecular and cellular pathways that cause XLCNM in cellular and animal models. I identified an alteration of the TIAM-RAC1-actin pathway, with a reduction in the levels of TIAM1, a RAC1 Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF), and a reduction of the RAC1 activity in muscles from *Mtm1<sup>-ly</sup>* mice, a faithful model of XLCNM. Actin dynamics were altered, with an increase in the G/F actin ratio in muscles, and a reduction in the number of perinuclear actin cables in the *Mtm1<sup>-ly</sup>* primary myoblasts. In addition, I revealed defects in paxillin expression, indicating defects in focal adhesions, altered YAP/TAZ-mediated mechanotransduction, and defects in nuclei localization in *Mtm1<sup>-ly</sup>* primary myotubes. In addition, reduction of *TIAM1* expression or inhibition of RAC1 activity mimic the XLCNM cellular phenotypes. Moreover, suppression of *TIAM1* in mice mimics motor defects associated with XLCNM and aggravates the motor and histological phenotypes of *Mtm1<sup>-ly</sup>* mice. My thesis results suggest the alteration of the TIAM-RAC1-actin pathway as a primary cause of XLCNM and Alteration in this pathway may represent a common pathomechanism in the other CNMs.

Keywords: RAC1, GTPase, centronuclear myopathy, actin, TIAM