

Une cible thérapeutique contre la myopathie myotubulaire

La kinase PI3KC2 β

Marie Goret, Jocelyn Laporte

Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC), Inserm U1258, CNRS UMR7104, Université de Strasbourg, Illkirch, France.
jocelyn@igbmc.fr



Les phosphoinositides 3-kinases

Les phosphoinositides 3-kinases (PI3K) constituent une famille d'enzymes qui agissent sur les lipides afin de contrôler le trafic membranaire et la signalisation cellulaire. Les PI3K modifient les phosphoinositides (PI)¹ en ajoutant un groupe phosphate en position 3', 4' ou 5' de leur cycle inositol, produisant ainsi les lipides PI(3)P, PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃. Les différents PI déterminent des sous-domaines membranaires et recrutent des effecteurs protéiques, contrôlant ainsi de nombreux processus cellulaires, tels que la survie, la prolifération, l'adhérence et la migration [1]. Chez les mammifères, il existe huit PI3K réparties en trois classes. Les membres de la classe I sont impliqués dans la croissance et la survie cellulaire, tandis que ceux de la classe II, tels que PI3KC2 α et PI3KC2 β , sont impliqués dans la dynamique membranaire et le trafic intracellulaire. Enfin, le seul membre de la classe III, Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*, ou PIK3C3), est essentiel pour l'autophagie et le trafic intracellulaire. Les kinases PI3K agissent de concert avec les PI3-phosphatases pour l'interconversion des PI, coordonnant ainsi la dynamique cellulaire.

Le dysfonctionnement d'une de ces kinases ou de ces phosphatases peut provoquer des déséquilibres cellulaires et entraîner des maladies, ce qui témoigne de l'importance physiologique

de ces enzymes et de leurs produits lipidiques [2]. Par exemple, une augmentation d'expression de la PI3KC α est associée à des syndromes hypertrophiques, certaines formes mutantes de PI3KC α favorisent le développement tumoral, PI3K γ est impliquée dans des immunodéficiences, et la perte de la phosphatase MTM1 (myotubularine) entraîne une myopathie.

La myopathie myotubulaire

La myopathie myotubulaire liée au chromosome X (XLCNM) est une maladie congénitale rare qui affecte principalement les muscles squelettiques et se manifeste par une faiblesse musculaire sévère, une hypotonie, et une difficulté respiratoire. Cette myopathie est caractérisée par une hypotrophie des fibres musculaires et une centralisation anormale des noyaux cellulaires. Elle est causée par des mutations inactivatrices dans le gène *MTM1*, qui code une PI3-phosphatase, la myotubularine [3, 4].

La perte de cette phosphatase entraîne une accumulation de PI(3)P dans le muscle [5]. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif de cette maladie. Dans une perspective de normalisation de la quantité de PI(3)P chez les personnes souffrant de cette myopathie, des études pré-cliniques ont précédemment montré que la perte totale de PI3KC2 β , catalysant la réaction opposée à MTM1 (Figure 1A), améliore le phénotype myopathique d'un modèle murin de la maladie [6, 7]. La suppression totale de cette kinase pouvant induire des effets délétères sur d'autres pro-

cessus cellulaires, nous avons cherché à déterminer si une inhibition sélective de son activité suffit à obtenir un effet thérapeutique (Figure 1B). Des souris porteuses d'une mutation faux-sens (Asp1212Ala) dans le site actif de l'enzyme PI3KC2 β , qui inhibe son activité kinase sans modifier la quantité de la protéine, ont été croisées avec des femelles *Mtm1*^{-/+} (hétérozygotes pour l'inactivation du gène *Mtm1*) et les descendants mâles ont fait l'objet d'une analyse approfondie de leur phénotype musculaire à l'âge de cinq semaines.

L'inhibition spécifique de l'activité kinase de PI3KC2 β rétablit la fonction et la structure musculaire dans le modèle murin de la myopathie myotubulaire

Nous avons étudié différents groupes de souris mâles : des souris de génotype « sauvage » pour *Mtm1* (*Mtm1*^{+/y}) et pour *Pik3c2b* (*Pik3c2b*^{+/+}) ; des souris *Mtm1*^{+/y} avec une inactivation partielle (hétérozygotes, *Pik3c2b*^{D1212A/+}) ou totale (homozygotes, *Pik3c2b*^{D1212A/D1212A}) de l'enzyme PI3KC2 β , pour vérifier l'absence d'effet phénotypique majeur de cette inactivation isolément ; des souris *Mtm1*^{-/y}, modèles de la myopathie humaine ; et des souris *Mtm1*^{-/y} avec une inactivation partielle (*Mtm1*^{-/y}/*Pik3c2b*^{D1212A/+}) ou totale (*Mtm1*^{-/y}/*Pik3c2b*^{D1212A/D1212A}) de PI3KC2 β , afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette combinaison génétique.

Amélioration de la fonction motrice et de la survie

Les souris *Mtm1*^{-/y} présentent une myopathie progressive à partir de l'âge

¹ Les phosphoinositides, appelés parfois lipides à inositol, sont des glycérophospholipides qui représentent environ 10 à 15 % des phospholipides membranaires.

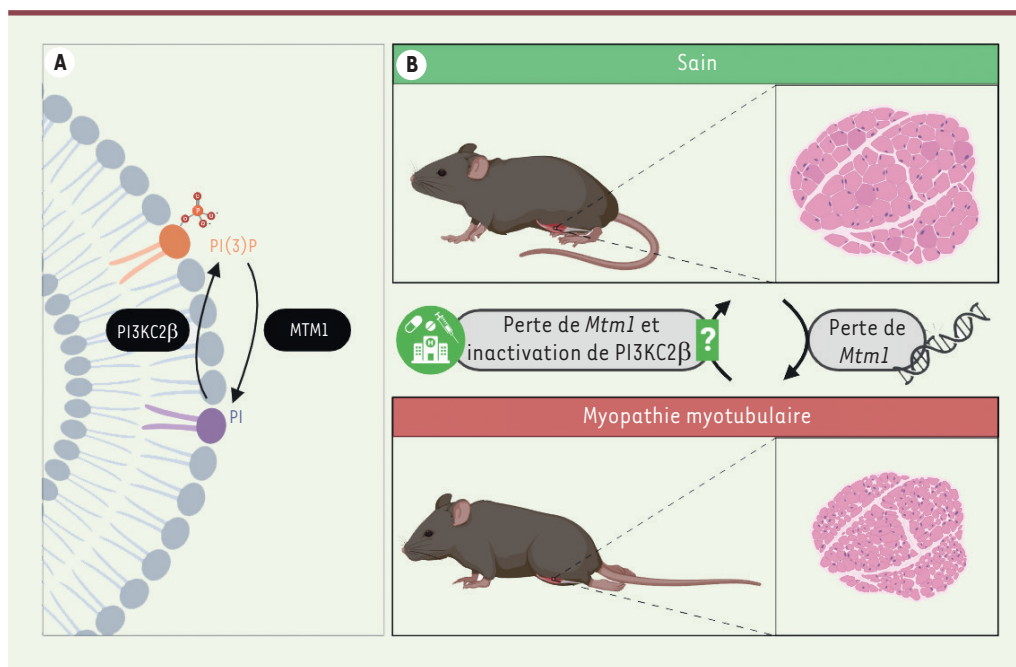


Figure 1. Activités de la phosphatase MTM1 et de la kinase PI3KC2β et leur implication dans la myopathie myotubulaire.

A. Les enzymes MTM1 et PI3KC2β, respectivement déphosphorylant et phosphorylant des phosphoinositides, sont impliquées dans l'homéostasie du phosphatidylinositol-3-phosphate [PI(3)P]. **B.** Illustration des conséquences d'une perte de MTM1 chez la souris mâle, entraînant faiblesse musculaire, atrophie des myofibres et délocalisation centrale de noyaux

cellulaires. L'objectif de l'étude est de tester, chez la souris, le potentiel thérapeutique de l'inactivation concomitante de PI3KC2β afin de normaliser la quantité de PI(3)P (Figure créée avec BioRender.com).

de 3 semaines, provoquant leur mort avant l'âge de 12 semaines (durée de vie moyenne : 7 semaines). L'inhibition de la kinase PI3KC2β a permis aux souris *Mtm1*^{-y}/*Pik3c2b*^{D1212A/D1212A} de survivre jusqu'à la fin de l'étude, soit 16 semaines. La fonction motrice des souris a été testée en évaluant leur capacité à rester suspendues à une grille. Dans ce test, les souris *Mtm1*^{-y} avaient des performances réduites, avec une durée moyenne de suspension de 16 secondes. En revanche, chez les souris *Mtm1*^{-y}/*Pik3c2b*^{D1212A/+}, nous avons constaté une légère amélioration de la durée de suspension (30 secondes en moyenne), cependant non statistiquement significative, alors que les souris *Mtm1*^{-y} / *Pik3c2b*^{D1212A/D1212A} ont atteint le maximum testé (60 secondes), tout comme les souris du groupe témoin (Figure 2A). Les souris *Mtm1*^{-y}/*Pik3c2b*^{D1212A/D1212A} avaient un poids corporel similaire à celui des témoins (30 g à 5 semaines), alors que les souris *Mtm1*^{-y} ne pesaient pas plus de 15 g, principalement du fait d'une atrophie musculaire générale. En effet, chez ces dernières, le poids de différents

muscles, tels que le muscle tibial antérieur, était environ moitié moindre que chez les souris témoins, alors qu'il était totalement normalisé chez les souris *Mtm1*^{-y}/*Pik3c2b*^{D1212A/D1212A} (Figure 2B). La force spécifique du muscle tibial isolé était très diminuée chez les animaux *Mtm1*^{-y}, mais normalisée chez les souris *Mtm1*^{-y}/*Pik3c2b*^{D1212A/D1212A} (Figure 2C) [8].

Amélioration de l'organisation des fibres musculaires

Après avoir constaté que l'inhibition de l'activité kinase de PI3KC2β améliorait l'atrophie et la faiblesse musculaire des souris *Mtm1*^{-y}, nous avons étudié la structure des myofibres de ces animaux. La coloration hématoxyline-éosine des coupes histologiques montrait une diminution de la taille des fibres chez les souris *Mtm1*^{-y} par rapport aux souris témoins (Figure 2D), la détection de l'activité de la succinate déshydrogénase sur ces coupes, et une accumulation anormale de produits d'oxydation mitochondriale dans 32 % des fibres (Figure 2E), des caractéristiques

histopathologiques similaires à celles décrites chez les personnes atteintes de la maladie. Les images et les mesures associées de la taille des fibres et du pourcentage de fibres affectées ont révélé un aspect et un diamètre normal des myofibres chez les souris *Mtm1*^{-y}/*Pik3c2b*^{D1212A/D1212A}, ainsi qu'une correction du positionnement des mitochondries. De plus, alors que l'analyse ultrastructurale des myofibres par microscopie électronique a révélé une désorganisation des sarcomères (les sous-unités musculaires) chez les souris *Mtm1*^{-y}, ainsi que des défauts des triades, des structures essentielles pour le processus d'excitation-contraction des myofibres, l'organisation ultrastructurale était restaurée partiellement chez les souris *Mtm1*^{-y}/*Pik3c2b*^{D1212A/+}, et totalement chez les souris *Mtm1*^{-y}/*Pik3c2b*^{D1212A/D1212A} [8].

Normalisation des quantités de PI(3)P et de ses fonctions cellulaires

PI3KC2β et MTM1 étant impliquées respectivement dans la phosphorylation et la déphosphorylation du PI(3)P, la

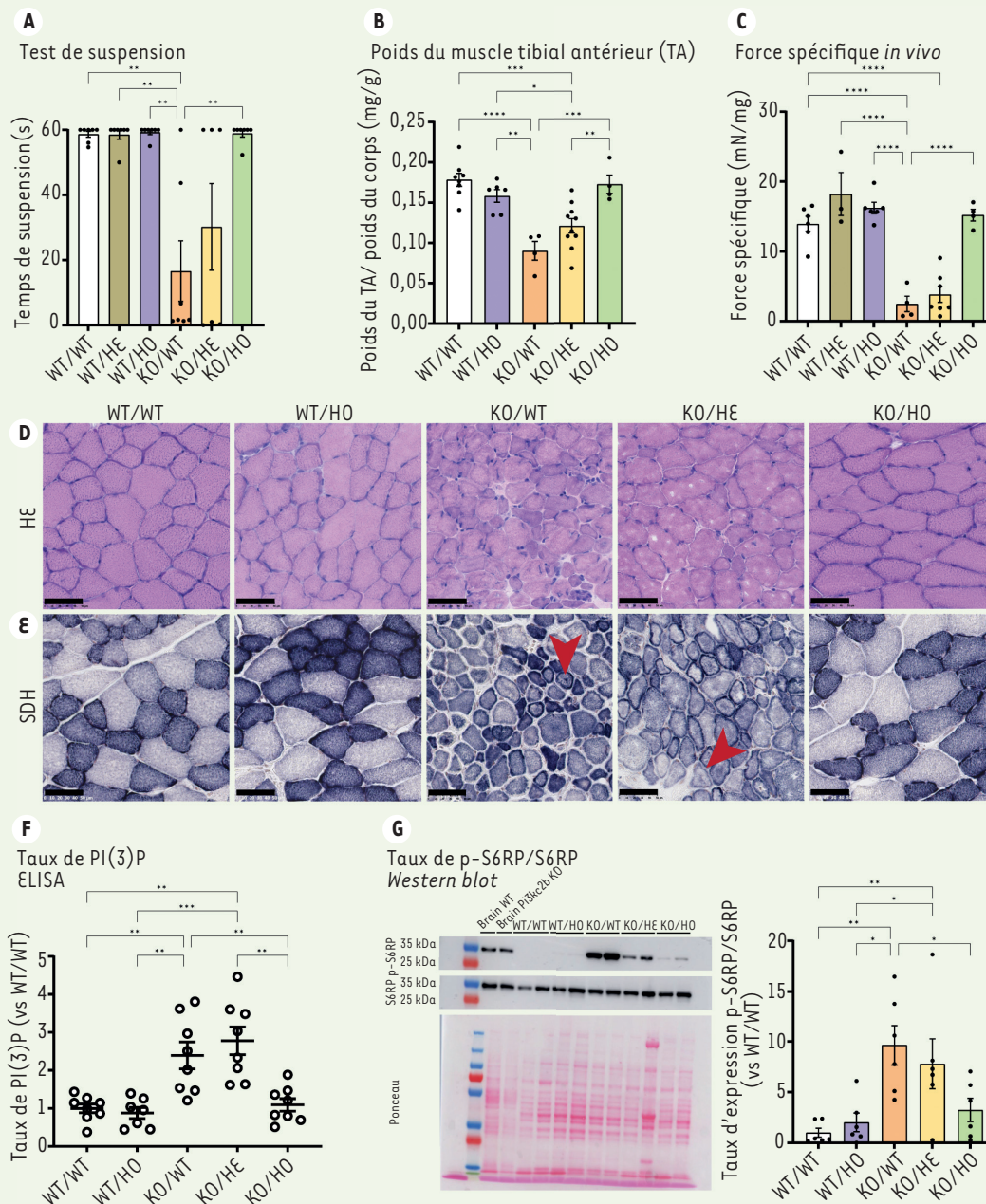


Figure 2. L'inhibition spécifique de l'activité kinase de PI3KC2 β rétablit la fonction et la structure musculaire dans le modèle murin de myopathie myotubulaire. **A.** Test de suspension à l'âge de 4 semaines. La durée de suspension des souris à une grille inversée est mesurée (temps limite testé : 60 s). **B.** Poids relatif du muscle tibial antérieur (TA) par rapport au poids total des souris à 5 semaines (mg/g). **C.** Force musculaire spécifique développée par le muscle TA par rapport à son poids (mN/mg). **D.** Coupes histologiques du muscle TA à l'âge de 5 semaines. Coloration par hématoxyline-éosine (HE). Barre d'échelle = 50 μ m. **E.** Coupes histologiques du muscle TA à l'âge de 5 semaines. Coloration reflétant l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase (SDH). Les flèches indiquent des accumulations centrales anormales de produits d'oxydation mitochondriale. Barre d'échelle = 50 μ m. **F.** Quantification, par la technique ELISA, des taux de PI(3)P dans le muscle gastrocnémien à l'âge de 5 semaines, normalisés par rapport au groupe témoin. **G.** Western blot d'extraits de muscle TA et de cerveau avec des anticorps dirigés contre les formes phosphorylée (p-S6RP) et totale (S6RP) de la protéine ribosomique S6, intervenant dans la voie de signalisation mTOR. Chaque échantillon est normalisé par une coloration de la membrane de nitrocellulose au rouge ponceau (révélant la quantité totale de protéines de l'échantillon), et les rapports p-S6RP/S6RP sont quantifiés puis normalisés par rapport au groupe témoin. WT : *wild-type* (souris mâles de génotype « sauvage » pour le gène *Mtm1* ou *Pik3c2b*) ; KO : *Mtm1*^{-/-} (souris mâles invalidés pour le gène *Mtm1*) ; HE : *Pik3c2b*^{D1212A/+} (souris mâles hétérozygotes pour l'inactivation de l'enzyme PIK3C2 β) ; HO : *Pik3c2b*^{D1212A/D1212A} (souris mâles homozygotes pour l'inactivation de l'enzyme PIK3C2 β). * : $p \sim 0,05$; ** : $p \sim 0,01$; *** : $p \sim 0,001$; **** : $p \sim 0,0001$.

concentration de ce lipide a été mesurée dans le muscle. La myopathie myotubulaire était associée à une augmentation de cette concentration de 2,5 fois par rapport aux souris témoins, et sa normalisation constatée chez les souris *Mtm1*^{-y}/*Pik3c2b*^{D1212A/D1212A} est donc vraisemblablement à l'origine des améliorations phénotypiques chez ces souris (Figure 2F) [8].

Chez la drosophile, les orthologues de *Pi3kc2b* et de *Mtm1* contrôlent le recyclage de l'intégrine $\beta 1$ (CD29) via les PI [7]. L'intégrine $\beta 1$ est une protéine transmembranaire reliant le cytosquelette à la matrice extracellulaire. Cette intégrine s'accumule anormalement à l'intérieur des myofibres des souris modèles de la myopathie XLCNM, ce qui peut expliquer certaines des anomalies histologiques constatées chez ces souris, telles que la présence de petites myofibres rondes et l'augmentation de l'espace entre les myofibres. L'accumulation de l'intégrine $\beta 1$ dans les myofibres des souris *Mtm1*^{-y} suggère une perturbation de son recyclage membranaire, qui serait alors corrigée dans les myofibres des souris *Mtm1*^{-y}/*Pik3c2b*^{D1212A/D1212A}, puisque la localisation membranaire de cette intégrine était rétablie chez ces souris [8].

Comme PI(3)P et PI3KC2 β contrôlent l'activité du complexe protéique mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) [9], nous avons analysé la voie de signalisation impliquant mTOR en mesurant la phosphorylation de la protéine ribosomique S6RP (*S6 ribosomal protein*), qui agit en aval de mTORC1. S6RP était davantage phosphorylée, donc davantage activée, chez les souris *Mtm1*^{-y} (par rapport aux souris témoins), mais aucune

suractivation n'a été constatée chez les souris *Mtm1*^{-y}/*Pik3c2b*^{D1212A/D1212A} (Figure 2G). L'amélioration de la myopathie chez ces dernières est donc associée à une normalisation de l'activité de la voie mTORC1.

Perspectives

Cette étude a montré que la suppression de l'activité kinase de PI3KC2 β permet de prévenir l'atteinte de la motricité, l'atrophie musculaire, ainsi que les anomalies histologiques et ultrastructurales des myofibres dans le modèle murin de la myopathie myotubulaire. Cet effet préventif s'accompagne de la normalisation de la quantité de PI(3)P dans le muscle, de l'activité de la voie de signalisation impliquant mTOR, et du trafic de l'intégrine $\beta 1$. Nous supposons que c'est en rétablissant l'homéostasie de PI(3)P que l'inhibition de l'activité de la kinase PI3KC2 β améliore les différents défauts de la structure et de la fonction musculaires constatés dans le modèle murin de la maladie. Par ailleurs, nous n'avons pas constaté d'effet toxique de la suppression de l'activité kinase de PI3KC2 β lors des tests effectués chez des animaux témoins. Dans l'ensemble, ces résultats plaident en faveur de l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'activité kinase de PI3KC2 β pour traiter la myopathie myotubulaire chez l'homme. Une inhibition de 50 % de l'activité de cette kinase pourrait déjà apporter une certaine amélioration fonctionnelle, bien que celle-ci n'ait été que minime chez les souris hétérozygotes pour la mutation inactivatrice de la kinase : une plus forte inhibition de l'activité enzymatique sera donc très vraisemblablement nécessaire pour obtenir un meilleur effet thérapeutique. Enfin, disposer d'un

tel inhibiteur pourrait également bénéficier à d'autres situations pathologiques [10], ouvrant ainsi la voie à de nouvelles opportunités thérapeutiques. ♦

The PI3KC2 β kinase as a therapeutic target for myotubular myopathy

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été soutenu financièrement par ANR-10-LABX-0030-INRT, ANR-10-IDEX-0002-02, réseau Marie Skłodowska-Curie n° 675392, ANR-17-RAR3-0006, ERARE17-152.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Hammond GRV, Burke JE. Novel roles of phosphoinositides in signaling, lipid transport, and disease. *Curr Opin Cell Biol* 2020 ; 63 : 57-67.
- Burke JE, Triscott J, Emerling BM, Hammond GRV. Beyond PI3Ks : targeting phosphoinositide kinases in disease. *Nat Rev Drug Discov* 2023 ; 22 : 357-86.
- Laporte J, Hu LJ, Kretz C, et al. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet* 1996 ; 13 : 175-82.
- Jungbluth H, Wallgren-Pettersson C, Laporte J. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis* 2008 ; 3 : 26.
- Dowling JJ, Vreede AP, Low SE, et al. Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet* 2009 ; 5 : e1000372.
- Sabha N, Volpatti JR, Gonorazky H, et al. PI3KC2B inhibition improves function and prolongs survival in myotubular myopathy animal models. *J Clin Invest* 2016 ; 126 : 3613-25.
- Ribeiro I, Yuan L, Tanentzapf G, et al. Phosphoinositide regulation of integrin trafficking required for muscle attachment and maintenance. *PLoS Genet* 2011 ; 7 : e1001295.
- Massana-Munoz X, Goret M, Nattarayan V, et al. Inactivating the lipid kinase activity of PI3KC2 β is sufficient to rescue myotubular myopathy in mice. *JCI Insight* 2023 ; 8 : e151933.
- Marat AL, Wallroth A, Lo WT, et al. mTORC1 activity repression by late endosomal phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate. *Science* 2017 ; 356 : 968-72.
- Anquetil T, Solinhac R, Jaffre A, et al. PI3KC2 β inactivation stabilizes VE-cadherin junctions and preserves vascular integrity. *EMBO Rep* 2021 ; 22 : e51299.



Tarifs d'abonnement m/s - 2024

Abonnez-vous
à *médicine/sciences*

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès
des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement page 202
dans ce numéro de m/s

